



**CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**INCIDÊNCIA DOS GENES *eaeA* E *stx1* EM *Escherichia coli*
ISOLADA DE CARCAÇA SUÍNA ABATIDA EM FRIGORÍFICOS
COMERCAIS NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Luís Alberto Pereira Machado

Lajeado, abril de 2014

Luís Alberto Pereira Machado

**INCIDÊNCIA DOS GENES *eaeA* E *stx1* EM *Escherichia coli*
ISOLADA DE CARÇA SUÍNA ABATIDA EM FRIGORÍFICOS
COMERCAIS NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante-Filho

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Pozzobon

Lajeado, abril de 2014

Luís Alberto Pereira Machado

**INCIDÊNCIA DOS GENES *eaeA* E *stx1* EM *Escherichia coli*
ISOLADA DE CARCAÇA SUÍNA ABATIDA EM FRIGORÍFICOS
COMERCAIS NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia:

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante-Filho –
Orientador
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Adriane Pozzobon -
Coorientadora
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Cláucia Fernanda Volken de
Souza
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Vanderlei Biolchi
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Nelson Alexandre Kreztmann
Centro Universitário UNIRITTER

Lajeado, abril de 2014



A você Elenara

Que plantou no meu coração o amor, o fez crescer e florir, me presenteou com os mais lindos frutos e quando eles voltaram a ser sementes me possibilitou a oportunidade de novamente voltar a viver e hoje, faz meus dias serem melhores pela sua maravilhosa presença irradiando luz e força de viver.

Todo o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Aos colegas que possibilitaram as coletas dos swabs nas carcaças suínas nas Unidades Produtoras, Maria Joana Basso Dias, César Henrique de Oliveira Salce, Carolina Wagner, Cristian Pertile Berton, Cristina Feltrin Pasinato, Roberto Kloeckner Jr., Carolina Sutille, Cristina Rosane Fritsch, Evelise Dalmoro, Laura Rosane Neutzling, Margarete Dittrich e Thaís Liberali.

Aos colegas que possibilitaram as análises microbiológicas dos swabs coletados e o envio das amostras para continuidade dos trabalhos, Louise Pissolatto, Marta Ione Souza dos Santos, Maryel Cláudia Reginato, Miriane Trentini.

A Carla Gelatti pelo auxílio e companheirismo na execução de análises.

As amigas Mirian Regina Machado Ritzel e Helena Caminha dos Santos pelo grande auxílio nas revisões de Português e Inglês, respectivamente.

Aos bolsistas da UNIVATES, Franciele Lucca e Jayse Alves, excelentes e dedicados técnicos, pelo suporte nas análises laboratoriais durante todo o período do trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante-Filho, pelo conhecimento compartilhado, pelo aprendizado disponibilizado, pelas dúvidas lançadas e principalmente pela oportunidade de realizar este trabalho na área de carnes, possibilitando ampliar meus conhecimentos através de uma visão acadêmica alinhada com a realidade do processo produtivo comercial.

RESUMO

A carne suína representa importante fonte de proteína animal para o mundo, porém vem sendo associada a surtos de toxinfecção alimentar. Uma das causas destes surtos é a contaminação por *Escherichia coli* (*E. coli*), encontrada no trato intestinal e ambiente dos suínos abatidos para produção de carnes *in natura* e industrializadas. No contexto de segurança alimentar, os surtos por *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são os melhores documentados. No mundo, diversos surtos causados por ingestão de alimentos de origem animal já foram documentados, porém no Brasil, existem poucos dados sobre a ocorrência de STEC em eventos de toxinfecção alimentar, bem como a presença nos animais e, consequentemente, na carne suína. O objetivo deste trabalho foi quantificar a contaminação por *E. coli* de carcaças suínas abatidos em frigoríficos comerciais localizados nos estados da Região Sul do Brasil, e identificar por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a presença de *E. coli* produtora das toxinas *stx1* e *eaeA*. Foram realizados swabs de 272 carcaças suínas em abatedouros frigoríficos localizados nos estados do RS, SC e PR. As contaminações por *E. coli* foram identificadas em 25 carcaças, sendo 20 estabelecimento do Rio Grande do Sul, cinco no do Paraná e nenhuma amostra positiva na coleta em Santa Catarina. Das amostras positivas foram extraídos DNA para genotipagem por PCR. Nenhuma amostra apresentou o gene *stx1*, porém o gene *eaeA* foi identificado em 13 amostras, nas diferentes regiões da carcaça. A identificação da incidência dos genes *eaeA* e *stx1* nas carcaças pela técnica de PCR pode ser uma ferramenta útil no rastreamento da contaminação bacteriana ao longo dos processos do abatedouro, podendo auxiliar na redução de casos de toxinfecções alimentares causadas por *E. coli* e outros microrganismos.

Palavras Chaves: Carne suína. *E. coli*. STEC. PCR. Toxinfecção alimentar.

ABSTRACT

Pork is an important source of animal protein for the world, but has been associated with outbreaks of food poisoning. One cause of these outbreaks is contamination by *Escherichia coli* (*E. coli*), found in the intestinal tract and environment of pigs slaughtered for production of “*in nature*” and industrialized meat. In the context of food safety, outbreaks of *Escherichia coli* Shiga toxin-producing (STEC) are the best documented. Worldwide, several outbreaks caused by ingestion of food of animal origin have been documented, however in Brazil, there are few data on the occurrence of STEC in food poisoning events, as well as the presence in pigs and, consequently, in pork. The objective of this study was to quantify the *E. coli* contamination of swine carcasses slaughtered in commercial slaughterhouses located in the southern states of Brazil, and identified by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the presence of toxin-producing *E. coli stx1* and *eaeA*. Swabs of 272 swine carcasses were performed in slaughterhouses located in the states of RS, SC and PR. Contamination by *E. coli* were identified in 25 carcasses, 20 from establishment of Rio Grande do Sul, 5 from Paraná and any positive sample collected in Santa Catarina. From the positive samples, for genotyping DNA were extracted by PCR. No sample showed the *stx1* gene, but the *eaeA* gene was identified in 13 samples, on different regions of the carcass. Identifying the incidence of *eaeA* and *stx1* genes in carcasses by PCR can be a useful tool in screening for bacterial contamination during the slaughtering processes, should help in the reduction of cases of food poisoning caused by *E. coli* and other microorganisms.

Key Words: Pork. *E. coli*. STEC. PCR. Food poisoning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo mundial de carne suína (mil ton)	18
Tabela 2 – Consumo mundial <i>per capita</i> de carne suína (Kg per capita)	19
Tabela 3 – Rebanho suíno por estado (milhões de cabeça)	20
Tabela 4 – Produção Mundial de carne suína (mil ton)	20
Tabela 5 - Distribuição de surtos de DTA nas regiões do Brasil de 2000 a 2011	32
Tabela 6 - Presença de <i>E. coli</i> em carcaças suínas por estado da região sul	48
Tabela 7 - Presença de <i>E. coli</i> em carcaças suínas por posição na carcaça.....	49
Tabela 8 - Presença de <i>E. coli</i> em carcaças suínas posição por estado da região sul.....	49
Tabela 9 - Presença de <i>eaeA</i> em carcaças suínas por posição na carcaça	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do processamento de suínos em abatedouros comerciais...	23
Figura 2 – Evolução dos surtos envolvendo <i>E. coli</i> no Brasil de 2000 a 2011*	32
Figura 3 – Modelo de Placas de Petrifilm™	35
Figura 4 - Pontos de coleta nas carcaças definidos pela Circular nº 130 do MAPA..	40

Figura 5 – Posição de coleta de swab na carcaça suína	40
Figura 6 - Etapas da análise microbiológica em Placa Petrifilm™	42
Figura 7 – Etapas da extração de DNA por proteinase K.....	44
Figura 8 – Primers para genotipagem das amostras positivas para os genes das toxinas Shiga (<i>stx1</i>) e Intimina (<i>eaeA</i>).....	44
Figura 9 – Condições de reação da análise pela PCR.....	45
Figura 10 - Curva de concentração de DNA na PCR para amplificação dos genes <i>stx1</i> (A) e <i>eaeA</i> (B). A seta indica o amplicon relativo ao gene, gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.....	50
Figura 11 – Amostras positivas e negativas para PCR do gene <i>eaeA</i> em cultura de <i>E. coli</i> de swab de carcaça suína. A seta indica o amplicon relativo ao gene. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína

APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

CGAL - Coordenação Geral de Apoio Laboratorial

CGDt - Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Desenvolvido pelo Sistema de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo

DNA - ácido desoxirribonucleico

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EHEC - *E.coli* Enterohemorrágicas

EIEC - *E.coli* Enteroinvasiva

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPEC - *E. coli* enteropatogênica clássica

ETEC - *E.coli* Enterotoxinogênica

EUA – Estados Unidos

FDA – Food and Drug Administration – USA

HC – Colite Hemorrágica

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISO – International Standard Organization

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NMP – Número mais provável

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCCB - Ponto Crítico de Controle Biológico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

SDS – Sódio Dodecil Sulfato

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde

SINAN-net – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIVEP_DDA – Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica – Doenças Diarréicas Agudas

SHU - Síndrome Hemolítico-Urêmica

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga *Stx* – toxina Shiga

TE – Tris – EDTA Buffer

UE – União Europeia

UFC – Unidade formadora de colônias

UHA – Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

VRB - Vermelho Violeta Bile

VT - Verotoxinas

VTEC - *E.coli* produtora de Verotoxina

WHO – World Health Organization



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 TEMA	14
1.2 Problema	15
1.3 Objetivos	15
1.3.1 Objetivo geral	15
1.3.2 Objetivos específicos.....	15
1.4 Justificativa.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 A suinocultura brasileira	17
2.1.1 O desenvolvimento da produção de carne suína	19
2.2 O processo de abate de suínos	21
2.3 Os Surtos de toxinfecção alimentar	24
2.4 A bactéria <i>Escherichia coli</i>	25
2.4.1 A <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	26
2.5 A toxinfecção pela presença de STEC	28
2.5.1 A toxinfecção por STEC no Brasil	30
2.6 A toxina Intimina	33
2.7 Identificação e genotipagem de <i>E. coli</i> patogênica.....	35
2.7.1 Análise microbiológica das amostras de carcaças de suínos <i>in natura</i> por placa de Petrifilm™	35
2.7.2 PCR – Reação em cadeia da polimerase.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Local de execução da pesquisa	38
3.2 Amostras.....	38
3.2.1 Definição estatística das amostras.....	38
3.2.2 A coleta das amostras	39
3.3 Diagnóstico microbiológico para <i>Escherichia coli</i> em carcaça de suínos <i>in natura</i>	41
3.4 Preparo da amostra para análise em Placas Petrifilm™	41
3.5 Extração de DNA das amostras com presença de <i>Escherichia coli</i>	43
3.6 Identificação dos genes <i>stx1</i> e <i>eaeA</i>	44
3.7 Detecção dos Produtos de PCR.....	46

3.7.1 Expressão dos resultados.....	46
3.7.2 Avaliação estatística dos resultados.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Análises microbiológicas das carcaças	48
4.2 Identificação dos genes <i>stx1</i> e <i>eaeA</i>	50
5 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	60
ANEXO A – Artigo Publicado	61
ANEXO B – Coleta de dados	79

1 INTRODUÇÃO

A carne suína representa, nas últimas décadas, uma importante fonte de proteína animal para o mundo, sendo seu consumo de ordem crescente e acelerada, contribuindo para a produção mundial com o incremento de 75,2 milhões de toneladas nos últimos anos. O Brasil, desde os anos de 1990, cresce com a produção de carne suína e ocupa atualmente o quarto lugar como produtor mundial desta proteína, com exportação de 581 mil toneladas no ano de 2013 (ABIEPCS, s/dc).

A ingestão de alimentos contaminados tem como resultado final os surtos de toxinfecção alimentar, devido, principalmente, a falhas no processo de fabricação, elaboração, conservação, exposição ou consumo de alimentos. A carne suína é um dos alimentos responsáveis por estes surtos, podendo sua origem estar relacionada à presença da *E. coli* que é possível de ser encontrada no trato intestinal dos animais abatidos e utilizados para a produção de carnes *in natura* e na industrialização de produtos, como presuntos, salsichas, mortadelas, salames, entre outros (GERMANO; GERMANO, 2003; MARGALL; DOMÍNGUEZ; PRATS et al., 1997).

No mundo são vários os registros de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), no Brasil a pequena quantidade registrada contribui negativamente para a demonstração estatística dos surtos ocorridos. Dados estatísticos mundiais demonstram o aumento de casos de DTA, principalmente pela oferta de produtos industrializados a base de proteína animal. As carnes são consideradas grandes hospedeiros de bactérias patogênicas, entre elas a *E. coli*. que ocupa o terceiro

lugar no país como agente etiológico responsável por surtos alimentares, onde estes números estão, principalmente, relacionados ao consumo de carnes contaminadas por esta bactéria (SVS/MS, 2011).

A *E. coli* é responsável pela maioria das toxinfecções alimentares entre turistas e viajantes no mundo, sendo a protagonista em cerca de 50% dos casos registrados (GERMANO; GERMANO, 2003). No contexto de segurança alimentar, os surtos por *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) a colocam em posição emergente como importante patógeno zoonótico de origem alimentar (MARTINS; SILVA; DUTRA et al., 2011).

A toxina Shiga é uma espécie de *E. coli* responsável pelos quadros de toxinfecção alimentar desencadeada pelo consumo de carnes suínas originárias do abate em frigoríficos de suínos contaminados por esta bactéria ou suas toxinas. Este trabalho está focado na identificação da toxina *stx1* e na *eaeA*, atuando sobre os controles de processos de abate para auxiliar na redução das contaminações e consequentemente, nos casos de toxinfecções humanas através da produção de carnes saudáveis e seguras.

Desta forma, o presente projeto de pesquisa investigou e identificou a incidência da contaminação de carcaças suínas abatidas em frigoríficos comerciais nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina por *stx1* e *eaeA*. Através de amostras de swabs coletadas no Ponto Crítico de Controle Biológico (PCCB) e detectadas por PCR, de modo a obtermos mais informações sobre carnes suínas com qualidade assegurada, através dos controles de processo que possibilitam o controle da STEC resultado das atividades de um abate higiênico e seguro, possibilitando produtos isentos de toxinas responsáveis pela toxinfecção alimentar.

1.1 TEMA

Incidência dos genes *eaeA* e *stx1* em *Escherichia coli* isolada de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos comerciais na Região Sul do Brasil.

1.2 Problema

Qual a prevalência de contaminação por *Escherichia coli* em carcaças suínas abatidas em frigoríficos comerciais localizados nos estados da região sul do Brasil?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Identificar o percentual de contaminação de carcaças suínas por *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) *stx1* e Intimina (*eaeA*) em abatedouros comerciais no sul do Brasil.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença de *E. coli* durante o processo de abate em diferentes pontos externos da carcaça suína por Placa Petrifilm™;
- Quantificar a contaminação por *E. coli* em amostras coletadas em diferentes pontos externos da carcaça suína por Placa Petrifilm™, após o PCCB;
- Identificar a presença de *E. coli* com os genes *eaeA* e *stx1* durante o processo de abate em diferentes pontos externos da carcaça suína (pernil, barriga, paleta e papada) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1.4 Justificativa

A carne suína apresenta grande potencialidade de surtos de toxinfecção alimentar no mundo, em virtude dos diversos pontos de elevado risco de contaminação ao longo da cadeia produtiva. Desta forma, são tomados cuidados necessários, iniciados na criação e mantidos até o abate destes animais para minimizar sua presença. Atualmente, os dados mundiais disponíveis referentes a

toxinfecção alimentar por *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e Intimina (*eaeA*) são descritos para outros tipos de carnes, resultando em reduzida informação relacionada a sua presença na carne suína. Os relatos de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), relacionados a STEC, associaram a linhagem a um amplo espectro de doenças causadas ao ser humano, variando de diarreia branda a complicações graves como a Colite Hemorrágica (CH) e a Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU), posicionando a STEC como a principal causa da insuficiência renal aguda em crianças. Os resultados deste estudo poderão nortear modificações em processos de criação e abate, buscando garantir a melhor qualidade do produto final *in natura* e da matéria-prima utilizada para a industrialização. A qualidade do platel dos animais criados pelo sistema de parcerias, os rígidos controles de fiscalização dos animais recebidos nos abatedouros destinando para o abate e a produção assegurada através de processos com padrões validados e reconhecidos internacionalmente, com o controle sobre as etapas produtivas que possibilitam a contaminação e a disseminação da toxina *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em carne suína destinada ao consumo humano, irão conferir a carne suína o status de alimento de alto padrão de qualidade, seguro e saudável.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A suinocultura brasileira

A carne suína consolidou-se como a mais importante fonte de proteína animal do mundo após 1978. A produção mundial cresceu numa taxa anual de 3,1% nos últimos 46 anos e, neste período, a produção foi acrescida em 75,2 milhões de toneladas. O Brasil atualmente é o terceiro maior produtor e o quarto maior exportador mundial de carne suína. A produção em 2012, no país, foi de aproximadamente 3,3 milhões de toneladas, aumento de 3,1% em relação à produção realizada no ano de 2011 (ABIEPCS, s/dc).

Até o início do século XXI, enquanto a produção mundial de carne suína cresceu a uma taxa de 3,3% ao ano, a produção nacional cresceu 2,6%. Somente a partir da última década do século XX, depois da ampla abertura comercial que possibilitou o crescimento das exportações nacionais através do incremento de tecnologias no setor, é que a suinocultura nacional reverteu esta situação, quando passou a crescer, vertiginosamente, a uma taxa anual de 5,7%, enquanto no resto do mundo este crescimento foi de somente 2,2% (ABIEPCS, s/dc).

Dois fatores são fundamentais para o comportamento negativo da produção suinícola brasileira até os anos de 1990: o primeiro está relacionado a nossa baixa inserção no comércio internacional e o segundo ao nosso baixo consumo per capita, pois tradicionalmente a carne suína não é parte integrante do cardápio da população brasileira. No caso das exportações nacionais, os problemas sanitários como a peste suína clássica (que afetou os rebanhos brasileiros, principalmente em Santa

Catarina nos anos 1980), impediu a participação mais efetiva do Brasil no mercado internacional até o ano de 1999 (EMBRAPA, 2013).

Outro problema considerado é o pequeno porte do comércio internacional de carne suína decorrente do alto protecionismo à produção local feito por diversos países e blocos econômicos, liderados principalmente pela União Europeia (UE) e pelos Estados Unidos (EUA), conforme dados contidos na Tabela 1. Não menos importante as restrições religiosas ao consumo de carne suína nas populações muçulmana e judia, interfere na entrada deste produto nas regiões do mundo seguidoras destes preceitos (ABIPECS, s/dc).

Tabela 1 – Consumo mundial de carne suína (mil ton)

País	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
China	45.099	45.014	42.710	46.691	48.823	51.157	50.004	52.725	54.250
U.E.	20.632	20.631	21.507	21.024	20.691	20.952	20.821	20.375	20.268
EUA	8.660	8.643	8.965	8.813	9.013	8.654	8.340	8.441	8.616
Rússia	2.086	2.279	2.534	2.789	2.719	2.835	2.971	3.145	3.090
Brasil	1.949	2.191	2.260	2.390	2.423	2.577	2.644	2.670	2.771
Japão	2.509	2.452	2.473	2.486	2.467	2.488	2.522	2.557	2.553
Vietnã	1.583	1.731	1.855	1.880	2.071	2.072	2.113	2.160	2.205
México	1.464	1.489	1.523	1.605	1.770	1.784	1.710	1.850	1.945
Coreia do Sul	1.311	1.420	1.502	1.519	1.480	1.539	1.487	1.546	1.596
Filipinas	1.198	1.239	1.275	1.270	1.356	1.418	1.432	1.446	1.533
Outros	6.713	7.931	7.174	7.312	7.425	7.569	7.890	8.203	8.413
Total	93.204	95.020	93.778	97.779	100.238	103.045	101.934	105.118	107.242

Fonte: ABPA, (s/da).

Em países do Oriente e Rússia, o consumo de carne suína, como se pode verificar na Tabela 2, faz parte do cardápio da população de forma cultural desde muitos anos, o que pode justificar a maior quantidade *per capita* consumida. No Brasil, a carne suína vem ganhando espaço, aumentando sua parcela na mesa do brasileiro, gradativamente, pelo consumo de carnes *in natura* e de industrializados com mais atrativo comercial para os embutidos como presuntos cozidos, mortadelas, linguiças e outros embutidos com origem na carne suína (ABIPECS, s/dc).

Tabela 2 – Consumo mundial *per capita* de carne suína (Kg per capita)

País	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Hong Kong	59,47	65,06	59,58	60,37	61,46	64,97	68,89	69,5	66,5
Macau	47,28	48,33	48,52	50,06	51,38	49,48	50,01	51,06	54,1
Belarus	28,77	28,61	29,46	31,64	31,77	35,83	34,93	40,5	46,5
U.E.	43,35	40,91	40,98	40,84	42,42	41,34	41,31	40,8	40,2
Montenegro	12,61	15,57	12,87	28,91	32,13	41,29	40,17	37,5	39,3
China	32,79	33,32	34,75	35,28	32,59	35,45	36,89	38,5	37,3
Taiwan	41,43	41,91	41,58	38,14	36,92	35,73	36,87	35,79	36,6
Sérvia	35,57	32,44	33,99	33,84	38,4	36,28	34,56	35,54	35,6
Suíça	33,07	32,75	33,25	34,02	33,62	33,5	33	32,7	32,3
Coreia Sul	26,98	27,92	27,31	29,51	31,13	31,4	30,51	31,64	30,2

Fonte: ABPA, (s/da).

Enquanto no mundo o consumo cresceu na ordem de 2,2%, enquanto que no Brasil o crescimento foi na ordem de 5,7%, aumento principalmente na década de 90 do século XX. Dados de 2013 demonstram que o Brasil exportou 581 mil toneladas de carne suína para 60 diferentes países, sendo a China o maior importador de carne suína do Brasil e consome anualmente 54.250 ton/ano, como demonstra a Tabela 1. No Brasil o consumo *per capita* é de cerca de 15,1 kg/pessoa ano, enquanto que em Hong Kong na China está na ordem de 66,5 kg/pessoa, aproximadamente 4 vezes maior (ABIEPCS, s/dc).

2.1.1 O desenvolvimento da produção de carne suína

No final do século XIX e início do século XX, com a imigração europeia para os estados do sul, a suinocultura ganhou um novo aliado. Esses imigrantes, vindos principalmente da Alemanha e da Itália, trouxeram para o Brasil os seus hábitos alimentares de produzir e consumir carne suína, bem como um padrão próprio de industrialização (ABIEPCS, s/dc).

A Região Sul detém os maiores rebanhos de suínos do Brasil. O estado de Santa Catarina está na liderança, com 7,8 milhões de cabeças, correspondendo a 30,2 % do rebanho nacional, seguido do estado do Rio Grande do Sul com 5,7 milhões de cabeças e pelo estado do Paraná com 5,1 milhões de cabeças, conforme

a Tabela 3. A Região Sul se consolida como a maior produtora de suínos no país com os três estados totalizando 18,6 milhões de cabeças, correspondentes a 72% do rebanho nacional (BRASIL, 2013).

Tabela 3 – Rebanho suíno por estado (milhões de cabeça)

Estado	Rebanho	% Rebanho Nacional
Santa Catarina	7,8	30,2
Rio Grande do Sul	5,7	22,1
Paraná	5,1	19,7
Minas Gerais	5,0	19,3
Mato Grosso	2,1	8,7
Total	25,7	100,0

Fonte: Scot Consultoria (2012).

O grande número de abatedouros e indústrias de transformação na Região Sul proporcionam índices de destaque para o desenvolvimento do consumo interno e da exportação de carne suína (EMBRAPA, 2013).

O Ministério da Agricultura (MAPA) fiscaliza as empresas que produzem carne suína para o mercado interno e exportação, conforme os dados de produção contidos na Tabela 4. Desta forma, a sanidade das carnes oriundas destes estabelecimentos é assegurada por rígidos controles de fiscalização estabelecidos por meio de medidas oficiais com referência em padrões validados e reconhecidos internacionalmente, e operacionalizados por equipes de médicos veterinários qualificados que compõem o Sistema de Inspeção Federal (SIF) (ABIPECS, s/dc).

Tabela 4 – Produção Mundial de carne suína (mil ton)

País	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
China	45.553	46.505	42.878	46.205	48.905	51.070	49.500	52.350	53.800
U.E	21.676	21.791	22.858	22.596	22.010	22.627	22.953	22.526	22.450
EUA	9.392	9.559	9.962	10.599	10.442	10.186	10.331	10.555	10.508
Brasil	2.710	2.830	2.990	3.015	3.130	3.195	3.227	3.330	3.370
Vietnã	1.602	1.713	1.832	1.850	2.090	2.090	2.130	2.175	2.220
Rússia	1.735	1.805	1.910	2.060	1.844	1.920	2.000	2.075	2.190
Canadá	1.765	1.748	1.746	1.786	1.788	1.771	1.797	1.840	1.835
Filipinas	1.175	1.215	1.250	1.225	1.246	1.260	1.288	1.310	1.350

(continua)

(continuação)

Japão	1.245	1.247	1.250	1.249	1.310	1.292	1.267	1.297	1.305
México	1.103	1.109	1.152	1.161	1.162	1.175	1.202	1.239	1.270
Coreia Sul	1.036	1.000	1.043	1.056	1.062	1.110	837	1.086	1.210
Outros	5.336	5.504	5.714	5.240	5.334	5.492	5.753	5.868	6.006
Total	94.328	95.026	94.585	98.042	100.323	103.188	102.285	105.651	107.514

Fonte: ABPA, (s/db).

Atualmente, os principais destinos da carne suína brasileira são a Ucrânia e a Rússia, que importam vários cortes, entre eles, paleta, pernil, lombo e sobrepaleta, contribuindo para a manutenção da nossa produção (ABIEPCS, s/dc).

2.2 O processo de abate de suínos

O abate de suínos, descrito na sequência representa o modelo convencional utilizado nos abatedouros comerciais e segue a descrição de Venturini, Sarcinelli e Silva (2007).

O processo de abate de suínos é realizado por diversas fases, todas as etapas devem ser feitas de forma que não afete a qualidade final da carne, se adotando medidas higiênicas e preventivas. O embarque e transporte dos suínos para o abatedouro pode acarretar sérios prejuízos ao criador, comprador ou ao frigorífico, devido lesões, perda de peso, diminuição na qualidade da carne e perda por morte de animais.

Os suínos oriundos do sistema de integração são transportados por caminhões até o abatedouro, e através de rampas são descarregados para as pocilgas de recepção. Os animais são inspecionados, separados por lotes de acordo com a procedência e permanecem nas pocilgas pelo período de descanso que antecede o abate, diminuindo o estresse e melhorando a qualidade da carne para que sejam estabelecidos os níveis normais de adrenalina e de glicogênio presente no sangue. Antes do abate o animal permanece em jejum por 8 horas. Na pocilga é aspergido água sobre os animais para auxiliar no processo “anti-stress”, bem como para efetuar uma pré-lavagem do couro. Os animais que foram separados na

inspeção sanitária são tratados e processados distintamente dos animais sadios, de forma diferenciada.

Os animais são conduzidos para o abate por lotes e durante o percurso são lavados com jatos de água clorada.

A insensibilização consiste na instantânea e completa inconsciência do suíno antes do abate, geralmente por choque elétrico de alta voltagem e baixa amperagem atrás das orelhas do animal (fossas temporais). O choque é efetuado por 6 a 10 segundos, posteriormente o animal é preso, por uma das pernas, a um transportador aéreo.

Deve ser realizada após a insensibilização em no máximo 30 segundos por meio de seccionamento dos grandes vasos ou punção diretamente no coração é feita retirada do sangue, que é recolhido para reaproveitamento. Os animais são pendurados em trilho aéreo para a drenagem do sangue. Terminada a sangria os animais passam novamente por um banho de aspersão e seguem para a escaldagem.

Os animais seguem pelo transportador aéreo e são imersos em banho de água quente tratada aquecida à 65°C. A escaldagem é feita em tanques metálicos com renovação constante de água para facilitar a remoção posterior dos pelos e dos cascos e para retirada do restante da sujidade presente no couro dos animais. A passagem pela escaldagem dura entre 2 a 5 minutos.

Após a escaldagem é feita a remoção dos pelos em depiladeiras, depois de passar pela máquina a remoção dos pelos remanescentes é feita manualmente com auxílio de facas. Os cascos dos suínos também são removidos pelo uso da faca, posteriormente é realizado o chamuscamento da carcaça a gás.

Inicialmente é realizada a oclusão do reto e sua amarração juntamente com a bexiga para evitar a contaminação da carcaça. Neste ponto, ocorre a remoção das cabeças, posteriormente é realizada a abertura neutral da carcaça que vai desde o pescoço até a região inguinal, por meio de uma faca e na sequência as vísceras são removidas. As vísceras são retiradas em operação manual, removidas e colocadas

em bandejas da mesa de evisceração, onde são separadas, inspecionadas e encaminhadas para seu processamento, de acordo com o resultado da inspeção.

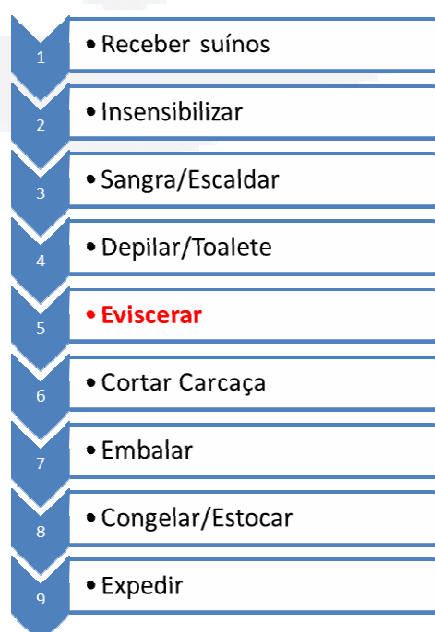
As carcaças são serradas longitudinalmente pela coluna vertebral, remove-se a medula e as carcaças são limpas internamente com facas ou equipamentos específicos. Estas carcaças são então inspecionadas, lavadas com água sob pressão e encaminhadas para o resfriamento por no mínimo 12 horas.

Após, as carcaças são transferidas para a sala de corte e desossa, onde se realiza a separação dos cortes principais por discos rotativos, os quais caem em mesas com esteiras contínuas, que depois de trabalhados e refilados, resultam em cortes específicos.

Os cortes finais são refilados, embalados e seguem para o congelamento até o produto atingir a temperatura de -18°C , depois são estocados a temperaturas controladas onde aguardam a expedição.

No transporte a higiene do caminhão é inspecionada e o rígido controle de temperatura sobre o produto carregado e o sistema de frio do caminhão é realizado para que o produto possa ser recebido nas mesmas condições que foi produzido.

Figura 1 – Fluxograma do processamento de suínos em abatedouros comerciais



Fonte: Venturini, Sarcinelli e Silva (2007).

A evisceração deve ser o ponto de maior controle de processo, pois é nesta etapa do abate que são realizadas as operações críticas que podem definir a presenças de contaminação das carcaças, devido aos equipamentos utilizados e a habilidade das pessoas nas atividades desenvolvidas.

2.3 Os Surtos de toxinfecção alimentar

A World Health Organization (WHO), segundo Pires, Shinohara e Rêgo et al. (2002), define enfermidade transmitida por alimentos como a oriunda de natureza infecciosa ou tóxica, causada por agentes decorrentes da ingestão de alimentos. A toxinfecção alimentar é um problema decorrente da ingestão de alimentos contaminados devido a falhas no processo de fabricação, elaboração, conservação, exposição ou consumo de alimentos. Os surtos ocorrem em situações especiais, envolvendo duas pessoas ou mais que apresentam síndromes semelhantes após a ingestão de alimento comum (PINTO; BERGMANN, 2000). Podem variar de leve a grave, podendo levar ao óbito. Alimentos de origem animal, como carnes em geral, industrializados de carne, leite, ovos, são os mais comumente responsáveis pelos surtos registrados.

A dificuldade na disponibilidade de dados sobre os surtos alimentares que acometem a população advém do baixo número de registros existentes. As pessoas acometidas pelas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), quando não procuram o médico, deixam de contribuir para o registro de dados estatísticos destes surtos, inviabilizando que sejam identificadas junto aos órgãos competentes. Em países desenvolvidos, as estatísticas oficiais indicam que as notificações sejam da ordem de 1 a 10% dos casos de DTA ocorridos, o que em países menos desenvolvidos não deve atingir o índice de 1% de casos notificados (OMS, 2002).

A carne suína é uma das responsáveis pela ocorrência de surtos de *Escherichia coli* O157:H7 (KARMALI, 1989; KARMALI; GANNON; SARGEANT et al., 2009). Também os produtos lácteos, como os leites crus e queijos, são considerados importantes veículos de contaminação. Do mesmo modo e não menos importante estão os sucos de frutas não pasteurizados e produtos de origem vegetal

consumidos crus que também constituem relevante perigo para a saúde pública (BETTS, 2000).

2.4 A bactéria *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* e *E. blattae*, sendo a primeira a de maior importância em saúde pública (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A *E. coli* é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo da família Enterobacteriaceae (ANGELES, 2002). Foi isolada pela primeira vez em 1885 das fezes de crianças com diarreia por um bacteriologista alemão, Dr. Theodor Escherich (HUTTEN; MORAES, 2000). Não apresenta termorresistência, sendo destruída a 60° C, em poucos segundos, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperaturas de refrigeração. O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para seu desenvolvimento. A multiplicação pode ocorrer abaixo do pH de 4,4 desde que os demais fatores intrínsecos e extrínsecos sejam ótimos e a atividade de água mínima exigida para seu desenvolvimento é de 0,95 (GERMANO; GERMANO, 2003).

A *E. coli* é encontrada normalmente no intestino dos animais e do homem, suprimindo bactérias nocivas e participando da síntese de algumas vitaminas como as do complexo B e vitamina K (MARGALL; DOMÍNGUEZ; PRATS et al., 1997). Esta estreita associação com as fezes do homem e dos animais representa a base do teste para verificação da contaminação fecal da água e dos alimentos, tão usado em saúde pública, por meio das análises de Coliformes Termotolerantes e Número Mais Provável (NMP) de *E. coli* (TRABULSI; ALTERTHUM; MARTINEZ et al., 2008).

A espécie de *E. coli* que existe normalmente nos intestinos de um determinado indivíduo é reconhecida e controlada pelo seu sistema imunitário, raramente causa problemas a este indivíduo, exceto quando de sua debilidade. A maioria das doenças é devido a *E. coli* vinda de indivíduos diferentes e portanto de espécies diferentes, não reconhecida pelos linfócitos do hospedeiro. As intoxicações alimentares em particular são quase sempre devidas a bactérias de espécies radicalmente diferentes, evitando que dentro de uma mesma área de atuação desta

E. coli exista uma população resistente a ela e vice-versa. (QUINN; CARTER; MARKEY, et al., 1995). O subgrupo *E.coli* Enterotoxinogênica (ETEC) é responsável pela grande maioria das intoxicações alimentares entre turistas e viajantes no mundo. Ao todo a *E. coli* é a causadora de 50% dos casos registrados. A prevenção para minimizar seus efeitos está no consumo de alimentos totalmente cozidos, evitar saladas e beber apenas água mineral ou outras bebidas oferecidas em recipiente selado (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.4.1 A *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

As *E. coli* produtora de toxina Shiga têm origem e desenvolvimento no intestino de animais ruminantes, sendo o gado a principal fonte da doença em humanos. Outros tipos de animais, incluindo suínos e pássaros, algumas vezes absorvem a *E. coli* no ambiente e podem disseminá-las no local em que estão inseridos. As infecções por *E. coli* produtora de toxina Shiga iniciam quando os indivíduos engolem as bactérias através de minúsculas quantidades (geralmente invisíveis) de fezes humanas ou de animais. Infelizmente isso acontece com mais frequência do que se imagina. Exposições que resultam em doença incluem consumo de comida contaminada, leite não pasteurizado, água não desinfetada, contato com gado, ou contato com fezes de pessoas infectadas (BEUTIN; GEIER; STEINHUCK et al., 1993).

Em 1977, as cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) foram descritas pela primeira, sendo reconhecidas como causadoras de doenças em humanos e animais somente em 1983. A patogenicidade das cepas de STEC parece estar associada a uma série de fatores, incluindo a produção de várias citotoxinas, chamadas coletivamente de toxinas Shiga (*stx*) similares à toxina produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* (HUSSEIN; SAKUMA, 2005; BEUTIN, 2006; CHAHED; CHINA; MAINIL et al., 1996).

O grupo das *E.coli* Enterohemorrágicas (EHEC) também chamadas de *E.coli* produtora de toxina Shiga (STEC) ou *E.coli* produtora de Verotoxina (VTEC) tornou-

se um dos mais importantes patógenos humanos devido ao seu potencial zoonótico emergente (BEUTIN, 2006).

Essas cepas ocuparam o segundo lugar, no período de 1993 a 1997, entre os principais agentes de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos, onde responderam por 7,4% dos surtos e 28,3% das mortes provocadas por bactérias naquele país (OLSEN; MACKINON; GOULDINO et al., 2000).

As STEC são responsáveis pela produção de dois tipos de toxina, a *stx1* e a *stx2*, codificadas por fagos temperados que estão íntegros no cromossomo da *E. coli* (STROCKBINE; MARQUES; NEWLAND et al., 1986). Essas estirpes também podem expressar a proteína intimina, codificada pelo gene *eae*, que constitui um fator de virulência responsável pela aderência altera a arquitetura das microvilosidades do epitélio intestinal. Linhagens de STEC que transportam os genes *stx1*, *stx2* e *eae* estão associadas a quadros severos de diarreia (SHAW; JENKINS; PEARCE et al., 2004), sendo que o gene *stx2* compreende 11 variantes distintas e é considerado o fator de virulência mais importante das STEC associado a doenças humanas (BRETT; HORNITZKY; BETTELHEIM et al., 2002).

No contexto da segurança alimentar, particularmente, os surtos por *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterotoxinogênica (ETEC) e *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são os melhores documentados. Os surtos por STEC têm ocorrido com maior frequência nos EUA, Canadá, Reino Unido e Japão. Até o início da atual década, em particular no Brasil, ainda não houve nenhum registro de casos de STEC. A toxina Shiga requer receptores altamente específicos na superfície das células, a fim de unir e penetrar no seu interior. Espécies como bovinos, suínos, e veados, que não sintetizam esses receptores, podem abrigar bactérias toxigênicas sem nenhum efeito doente, derramando-as pelas suas fezes e possibilitando a transmissão aos seres humanos (GERMANO; GERMANO, 2003).

As infecções por STEC são geralmente diagnosticadas por teste laboratorial de fezes. Identificar a variedade específica de *E. coli* é muito importante para propósitos de saúde pública. O tratamento com terapia não específica, incluindo hidratação, é importante. Antibióticos não devem ser usados no tratamento, pois não

existe evidência que tratamento com antibióticos ajude, e o uso poderia elevar o risco de Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU). Agentes contra a diarreia também poderiam elevar esse risco (CVE, 2007).

A infecção por *E. coli* produtora de toxina Shiga pode ser prevenida com alguns cuidados básicos de higiene, como lavar as mãos cuidadosamente depois de usar o banheiro, de trocar fraldas, antes de preparar ou comer alimentos, lavar as mãos depois de contato com animais em seu ambiente (fazendas, zoológicos, feiras), evitar o consumo de carnes mal cozidas e de leite não pasteurizados e, ao nadar em lagos, represas e piscinas, não engolir estas águas (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007).

2.5 A toxinfecção pela presença de STEC

As STEC são reconhecidas como um importante grupo de patógenos emergentes e por seu elevado grau de infectividade, pois mesmo em quantidades pequenas, em torno de 10 Unidade Formadora de Coloniais (UFC), quando ingerida pelo homem podem provocar infecções. Estas bactérias tem sido o foco de atenção e da captação de informações sobre sua epidemiologia e seus reservatórios, devido ao aumento de ocorrência de surtos alimentares por elas causados em todo o mundo. Soma-se isto ao fato delas estarem direta ou indiretamente ligadas a cadeia alimentar dos seres humanos, responsabilizando-se pela causa de graves doenças ligadas ao consumo de carnes no mundo (WHO, 1998).

As estimativas demonstram que, nos EUA, a STEC, oriunda da carne bovina, seja a protagonista de 10.000 a 20.000 episódios anuais de DTA e a responsável por cerca de 200 a 500 óbitos por insuficiência renal aguda, evidenciados mais frequentemente em crianças e jovens (BROTAM; GIANELLA; ALM et al., 1995).

A partir do relato de surto causado por STEC no ano de 1982, a linhagem foi associada a um amplo espectro de doenças no ser humano, variando de diarreia branda a complicações graves como a SHU (NATARO; KAPER, 1998), sendo este

agente, considerado como a principal causa da insuficiência renal aguda em crianças nos Estados Unidos (KENSCH; ACHECON, 2002).

Os casos de diarreia por STEC excederam 2% em países como Alemanha, Noruega, Suíça e Áustria, enquanto que na Itália foi menor que 1%. Os casos de SHU, considerada um bom indicador da frequência das infecções por STEC, apresentam maior facilidade de identificação da toxina por exigir hospitalização dos vitimados (CAPRIOLI; TOZZI, 1998).

Os países com maior incidência de SHU no continente Europeu são Alemanha com 19 casos para cada 100.000 crianças até 15 anos, seguida pela Holanda, Suíça e Bélgica com 1,5 para 100.000. Os países do Sul da Europa possuem uma menor incidência de SHU nessa faixa etária sugerindo uma menor frequência de infecção por STEC (CAPRIOLI; TOZZI, 1998), em 2011, na Alemanha, ocorreu um novo surto por STEC com aumento significativo de pacientes com a SHU (MANGIA, 2011).

O Canadá monitora as infecções por STEC desde 1990, sendo que em 1991 foi registrado o maior surto de infecção por STEC já ocorrido no mundo, onde foram notificados 521 casos entre os esquimós, sendo 22 casos de SHU e duas mortes (SPIKA; KHAKHRIA; MICHEL et al., 1998). O país aponta que entre 1993 e 1995, 93% dos casos de infecções provocadas por STEC foram causadas pelo sorogrupo O157, evidencia, também, o declínio da incidência devido aos programas de boas práticas de fabricação e análises laboratoriais implantados nas atividades de controle de produção de alimentos.

No Japão, entre 1991 a 1995, ocorreram 29 surtos provocados por *E. coli*, dos quais quatro destes surtos ocorreram em jardins de infância, seis ocorreram em escolas primárias e 19 ocorreram entre familiares (MICHINO; ARAKI; MINAMI et al., 1998).

Nos Estados Unidos, na cidade de Michigan, foi realizado estudo das STEC isoladas entre 2000 e 2005, onde foram avaliados mais de 389 pacientes com STEC, 62% destes eram brancos e aproximadamente metade eram mulheres. A

doença ocorreu em menos de 27% das pessoas com 10 anos de idade, 19% com 11 a 18 anos e 17% em pessoas com 19 a 23 anos de idade. Embora a frequência em pessoas maiores de 65 anos tenha sido menor (9%), esta faixa etária é hospitalizada com maior frequência que os menores de 18 anos, com diarreia sanguinolenta ou SHU (MANNING; MADERA; SCHENEIDER et al., 2007).

A maior incidência de SHU em crianças de até quatro anos, nos últimos 30 anos, foi apontada na Argentina, onde os casos de SHU ocorridos apresentam-se de 7 a 10 vezes mais altos do que os relatados em outras partes do mundo. Neste país a carne bovina é a proteína de origem animal mais barata. As crianças iniciam o consumo de carne muito cedo, 20% aos cinco meses de idade e 80% delas consomem carne três vezes por semana. Na Argentina 80% da carne consumida não passa por controles e inspeção adequada, o que justifica a alta incidência de infecções por STEC (LOPEZ; CONTRINI; ROSA et al., 1998).

A emergência deste patógeno gerou grande preocupação mundial, pelo número de pessoas afetadas e por distintos veículos de transmissão identificados (ressaltando produtos de origem animal), o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a promover medidas de controle e prevenção.

2.5.1 A toxinfecção por STEC no Brasil

No Brasil o sistema de vigilância dificulta a estimativa de doenças transmitidas pela carne e seus derivados, pois os casos de toxinfecção são poucos e às vezes não informados (SVS/MS, 2011), embora sejam reconhecidos casos esporádicos de diarreia provocados pela STEC que ocorrem com mais frequência em crianças (PATON; PATON, 1998), estudos realizados em São Paulo e no Paraná utilizando fezes de crianças com diarreia apontam frequência de STEC de aproximadamente 1%. Surtos associados à STEC ainda não foram confirmados no país (GUTH; RAMOS; CERQUEIRA et al., 2002; TONI; SOUZA; KLASSEN et al., 2004).

Dados demonstram que no Brasil, entre os anos de 2000 e 2011, foram notificados 8.663 surtos de doenças veiculadas por alimentos com 163.425 pessoas

doentes e 112 óbitos (SVS/MS, 2011). O número de casos de doenças veiculadas por alimentos notificados em todas as regiões do Brasil, entre os anos de 2007 e 2010, de acordo com o Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica – Doenças Diarreicas Agudas (SIVEP_DDA), foi de 14.059 casos no total. Quando comparado aos casos notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-net), esse total cai para 3.670 casos, uma diferença entre órgãos de notificação de mais de 73%.

Na última análise epidemiológica para DTA realizada no Brasil, avaliando os períodos entre os anos 2000 e 2011, o perfil de local de ocorrência das DTA se manteve o mesmo da avaliação passada, ou seja, o ambiente residencial ainda foi apontado como sendo o principal local de ocorrência de DTA, seguido de restaurantes e escolas consecutivamente. Entre os anos de 2000 e 2011, o local de ocorrência não foi informado em 26,5% dos relatos de investigação epidemiológico das DTA, índice 2,1% maior que na avaliação anterior que compreendia o intervalo entre os anos de 1999-2004 (SVS/MS, 2011).

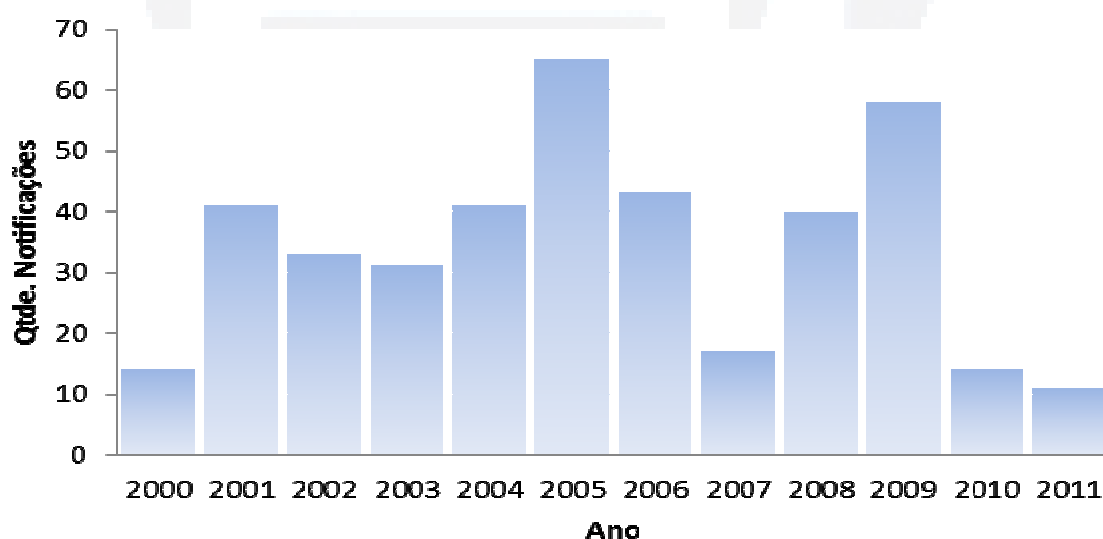
A distribuição demonstrada na Tabela 5, também nos possibilita refletir sobre nível de desenvolvimento social das regiões onde os surtos de DTA são mais registrados, contribuindo com as estatísticas do país. Quanto aos alimentos envolvidos em surtos alimentares no Brasil, de 2000 a 2011, a carne suína aparece nas pesquisas como o décimo item responsável pelos surtos de DTA, posterior a carne bovina que se apresenta em oitava colocação, num total geral de 324 alimentos identificados no ano de 2011. A lista é liderada por alimentos mistos, seguido por ovos e produtos a base de ovos. Conforme os dados da Tabela 5, o grande número de surtos presentes nas regiões Sul e Sudeste não necessariamente as caracteriza como as que apresentam a maior potencialidade de casos existentes, mas sim como as que possuem o maior número de casos notificados (SVS/MS, 2011).

Tabela 5 - Distribuição de surtos de DTA nas regiões do Brasil de 2000 a 2011

Região	%
Região Sul	42,1
Região Sudeste	37,3
Região Nordeste	12,0
Região Centro-Oeste	5,2
Região Norte	3,4
Total	100,0

Fonte: Brasil (2011).

As carnes são consideradas grandes hospedeiras de bactérias patogênicas, entre elas a *E. coli*, responsáveis por grande número de surtos de DTA no Brasil. Os dados de surtos envolvendo *E. coli* tem demonstrado oscilações e até uma tendência de redução nos últimos anos no país, conforme se constata na Figura 2. Estes números estão também relacionados com a ingestão de alimentos de origem animal, onde a carne bovina, culturalmente, apresenta consumo superior ao da carne suína (SVS/MS, 2011).

Figura 2 – Evolução dos surtos envolvendo *E. coli* no Brasil de 2000 a 2011*

Fonte: Brasil (2011).

2.6 A toxina Intimina

As cepas patogênicas de *E. coli* possuem outros fatores de virulência como a intimina (eae), proteína essencial para promover a íntima ligação da bactéria à superfície das células gastrointestinais e promover a lesão intestinal “attaching-and-effacing” (A/E) (CARDOSO, 2009).

A presença do gene *eae* ocorre em bactérias entéricas como *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e *E. coli* verotoxigênica (VTEC), que apresentam a alteração histológica A/E (KAPER; GANSHEROFF; O'BRIEN et al., 1998). O gene *eae* codifica para a intimina proteína localizada na membrana externa da VTEC, que apresenta a região N-terminal altamente conservada e variações em sua porção C-terminal, ligando-se aos receptores, podendo ser em diferentes tipos imunológicos denominados alfa (α), beta (β), gama (γ 1 e γ 2), δ (delta) (ADU-BODIE; FRANKEL; BAIN et al., 1998), epsilon (ϵ) (OSWALD; SCHIDT; MORABITO et al., 2000), zeta (ζ), eta (η), teta (θ), iota (ι) e kappa (κ) (ZHANG; KÖHLER; OSWALD et al., 2002).

A patogenicidade da *E. coli* é oriunda de vários mecanismos complexos e está relacionada a vários fatores de virulência. A patogênese das infecções por *E. coli* é dividida nas seguintes etapas: sobrevivência no ambiente ácido do estômago, adesão à mucosa e colonização do cólon, produção e absorção das toxinas e lesão vascular (YOON; HOVDE, 2008; KARMALI; GANNON; SARGEANT et al., 2009).

As *E. coli* possuem a capacidade de adaptar-se e sobreviver no ambiente ácido do estômago (LAW, 2000) e graças a esta capacidade de adaptação, é relativamente pequeno o número de bactérias necessárias para causar uma infecção (FDA, 2001).

Após sobreviver a barreira gástrica, as *E. coli* sobreviventes atingem o intestino grosso aderindo à mucosa. A relação entre a presença do gene *eae* e a *E. coli*, segundo os relatos, é direta, possibilitando na capacidade da toxina em causar doenças graves nos seres humanos. O gene *eae* codifica uma proteína externa de membrana, denominada Intimina. Esta proteína é um fator de virulência mediador no ataque ao enterócito, produzindo a lesão intestinal do tipo “attaching and effacing”

(AE); “attaching” que indica íntima adesão ao enterócito e, “effacing”, desaparecimento das microvilosidades da borda em escova do epitélio intestinal (WILLSHAW; SCOTLAND; SMITH et al., 1994; CHINA; PIRSON; MAINIL et al., 1996).

Depois de aderir à mucosa do intestino, ocorre a proliferação do microrganismo, colonização do cólon e produção de toxinas (PATON; PATON, 1998). As células endoteliais são primariamente atingidas, sendo as renais as que possuem um maior número de receptores para as toxinas desta bactéria transportadas pelas hemácias (HUTTEN; MORAES, 2000).

Vários pesquisadores, trabalhando com cepas mutantes, estudaram a função do gene *eaeA* da *E. coli* 0157:H7 e seu produto, a intimina, conforme relata Doyle, Zhao e Meng et al. (1977), onde ficou evidenciado que o gene *eaeA* é necessário para a aderência deste microrganismo aos enterócitos e células de linhagens, e está presente em várias cepas produtoras de verotoxinas (VT), particularmente naquelas associadas com doenças em humanos (FUKUSHIMA et al., 2000), mas outros fatores de patogenicidade são também importantes para o desenvolvimento da doença (NATARO; KAPER, 1998).

O mecanismo pelo qual VTEC produz lesão A/E vêm dos estudos realizados com a região LEE (*Loccus of enterocyte effacement*), ilha de patogenicidade de 35 kb, do sorotipo 0157:H7. Esta região não está presente em *E. coli* da microbiota ou em cepas de *E. coli* enterotoxigênica, mas é encontrada em cepas de EPEC, VTEC, *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium* capazes de produzir lesão A/E (KAPER; GANSHEROFF; O'BRIEN et al. 1998).

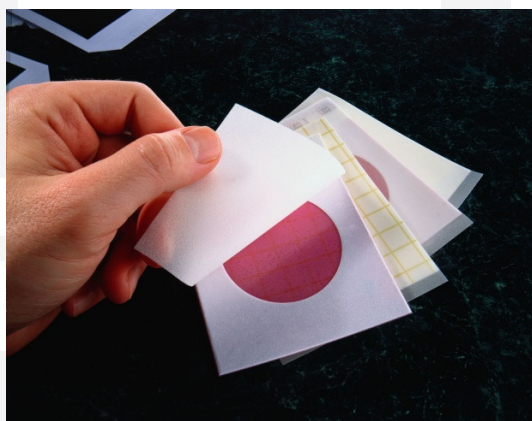
Em humanos, *E. coli eae* positivos estão relacionados a quadros severos de diarreia, principalmente colite hemorrágica (HC), e síndrome hemolítica-urêmica (SHU) (KARMALI, 1989; PATON; PATON, 1998).

2.7 Identificação e genotipagem de *E. coli* patogênica

2.7.1 Análise microbiológica das amostras de carcaças de suínos *in natura* por placa de Petrifilm™

As Placas Petrifilm™ são sistemas prontos de meio de cultura que contêm diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores adequados à recuperação de cada tipo de microrganismo pesquisado. Esses componentes são impregnados nas camadas internas de dois filmes, Figura 3, o superior em polipropileno, e o inferior em polietileno, sendo sobrepostos e fixos apenas na extremidade superior, o que confere ao produto maior facilidade para manuseio (3M™, 2009).

Figura 3 – Modelo de Placas de Petrifilm™



Fonte: 3M™ (2009).

As Placas Petrifilm™ para contagem de *E. coli* contêm nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB), um agente geleificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica e um indicador que facilita a enumeração da colônia. A maioria das *E. coli* (cerca de 97%) produz beta-glicuronidase na qual forma um precipitado azul associado a colônia. O filme superior retém o gás formado pela *E. coli* que são fermentadores de lactose. Cerca de 95% das *E. coli* produzem gás indicadas pelas colônias azuis a vermelho-azuladas, associadas ao gás retido na Placa Petrifilm™ EC (dentro de, aproximadamente, o diâmetro de uma colônia) (3M™, 2009).

O método de análise microbiológica por Placa Petrifilm™ é aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Ofício Circular nº 01 micro de 2010 da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL).

2.7.2 PCR – Reação em cadeia da polimerase

Em 1986 Kary Mullis e seus colaboradores desenvolveram a tecnologia para a aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR). A partir deste evento a aplicação da PCR tem provocado grande impacto nos estudos da biologia molecular, devido à sua sensibilidade e especificidade na amplificação de pequenas quantidade de DNA em milhões de cópias para detecção, sequenciamento, clonagem e diagnóstico e outros (HUSSEIN; SAKUMA, 2005).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos principais métodos moleculares utilizados para detecção de STEC (PARK; WAROBO; DURST, 1999), apresentando como vantagens a especificidade e sensibilidade bem como a rapidez na sua execução da técnica (PATON; PATON, 1998). A desvantagem está na presença de inibidores da reação presentes na própria amostra e a facilidade de contaminação durante o processo (BRIAN; FROSLONO; MURRAY et al., 1992). Além disso, a sequência a ser escolhida para o “primer” iniciador deve conter uma região bastante conservada para que não ocorra a diminuição na eficiência do anelamento (PATON; PATON, 1998).

Os métodos para a tipagem de gene *stx* baseados em análise de ácidos nucléicos incluem, principalmente, os ensaios com endonucleases de restrição. As análises estão fundamentadas no uso de enzimas produzidas por bactérias e denominadas endonucleases de restrição. Estas enzimas cortam o DNA em sequências específicas compostas por quatro a seis pares de base. Após o tratamento com estas enzimas, ocorre a formação de fragmentos, cujos tamanhos são determinados via eletroforese. A separação dos fragmentos é obtida por eletroforese em gel de agarose, e a visualização é realizada por coloração do gel com brometo de etídio. A diferença (polimorfismo) no tamanho dos fragmentos de DNA gerados pelo tratamento com 20 endonucleases de restrição é denominada

“polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição” ou RFLP. Esta técnica pode ser aplicada em estudos epidemiológicos e permite a identificação de subtipos de Stx (KONEMAN et al., 2001).

Existem ainda técnicas que, além de identificar os subtipos já descritos, propiciam a detecção de novas variantes como é o caso do sequenciamento, um processo molecular que determina a sequência real de nucleotídeos num fragmento de DNA. Existem vários métodos disponíveis, e cada um apresenta vantagens e desvantagens. Um dos mais utilizados é o chamado “método didesoxi” conhecido também como de “terminadores de cadeia” descritos por Sanger. O sequenciamento permite comparações entre seqüências e permite a detecção de novas variantes *stx1* e *stx2* (MICKLOS et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução da pesquisa

As amostras de swabs de carcaças de suínos desta pesquisa foram coletadas em três abatedouros frigoríficos comerciais nos Estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS). A obtenção das amostras ocorreu nos meses de março a setembro de 2013, considerando as normas de higiene e segurança dos alimentos em processo normal de abate de suínos. Por motivos comerciais, o nome da organização onde o trabalho foi realizado não será divulgado. O recolhimento amostral foi realizado seguindo a norma de coleta e acondicionamento de amostras definida pela Circular 130 de 2007 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo os swabs preparados e analisados microbiologicamente para *E.coli* em Placa Petrifilm™ e em PCR para a identificação de STEC – *stx1* e *eaeA* nos Laboratórios de Biologia Molecular e Biotecnologia da Univates.

3.2 Amostras

3.2.1 Definição estatística das amostras

Para estimar a prevalência da STEC, o tamanho adequado de amostra foi calculado, estatisticamente, com base no número de animais abatidos nestes estabelecimentos.

Foi considerada a quantidade de suínos prevista para o abate do ano e numa prevalência esperada de 5%, em nível de confiança de 95% e para uma precisão de 5% foi utilizado como ferramenta estatística o software Win Episcope 2.0 (Universidad de Zaragoza, Espanha). Desta forma as amostras foram constituídas aleatoriamente de 30 carcaças de suínos para o estabelecimento do RS e 19 carcaças para os estabelecimentos de SC e PR.

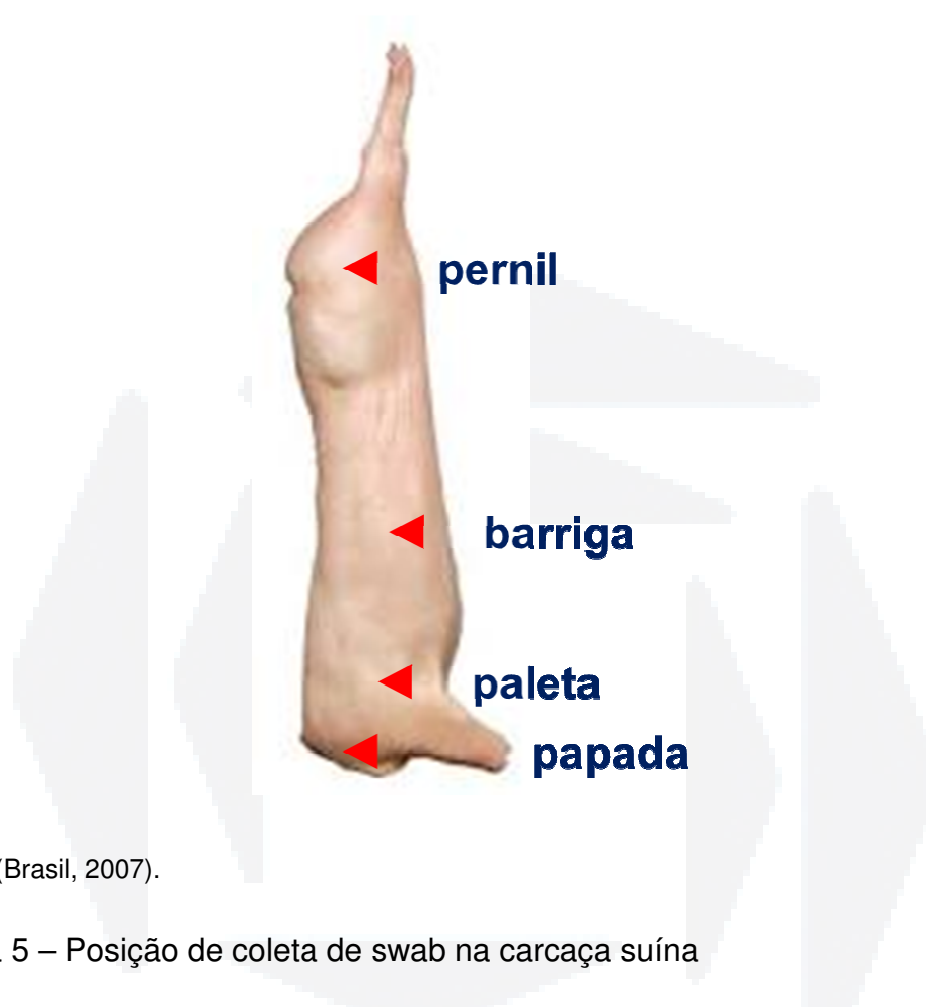
As coletas amostraram, segundo a Circular nº 130 do MAPA quatro pontos da carcaça (pernil, paleta, barriga e papada) obtidas aleatoriamente em diversos dias, produtores e horários de coleta. Considerando que em cada carcaça foram coletadas quatro amostras de swabs, a quantidade de pontos de swabs coletados foi definida pela avaliação estatística como sendo de 120 pontos no estabelecimento do RS e 76 pontos em cada um dos estabelecimentos de SC e PR, totalizando 272 pontos de swabs coletados para o experimento.

3.2.2 A coleta das amostras

Visando os ensaios microbiológicos, as amostras foram coletadas em ambientes de abatedouro frigorífico de suínos com animais oriundos de sistema de integração, fiscalizados pelo Sistema de Inspeção Federal (SIF).

No estabelecimento inspecionado as amostras foram constituídas aleatoriamente de 30 carcaças de suínos no RS e 19 carcaças de suínos em SC e PR, obtidas aleatoriamente em diversos dias e horários de coleta. As amostras de “swabs” superficiais de carcaças foram coletadas em quatro pontos distintos da carcaça (pernil, barriga, paleta e papada), seguindo as definições da Circular nº 130 do MAPA sempre no mesmo local no processo de abate no frigorífico, imediatamente após o ponto denominado no HACCP de Ponto Crítico de Controle Biológico (PCCB), sendo as amostras coletadas em cada um dos pontos definidos para as coletas nas carcaças, conforme indicados nas Figura 4 e 5.

Figura 4 - Pontos de coleta nas carcaças definidos pela Circular nº 130 do MAPA



Fonte: (Brasil, 2007).

Figura 5 – Posição de coleta de swab na carcaça suína

Posição na carcaça suína			
Pernil – ponto 1		Paleta – ponto 3	
Barriga – ponto 2		Papada – ponto 4	

Fonte: Do autor (2013).

Definido os pontos de coleta na carcaça e a quantidade de suínos, a área a ser amostrada para coleta na superfície das carcaças foi delimitada por molde estéril de aço inox com área interna livre de 10 cm² por ponto de coleta, onde foram efetuados os esfregaços com uso de “swabs”, devidamente esterilizados e previamente umedecidos em solução fisiológica peptonada 0,1 %. Durante a coleta os swabs serão identificados por local de coleta na meia carcaça, horário e produtor, armazenados individualmente em embalagens de vidro fechados com rosca, evitando ao máximo a contaminação pelas mãos do operador, que portará luvas, remetendo a posterior refrigeração e envio ao laboratório.

As amostras das carcaças foram analisadas para a microbiologia por meio de pesquisa em Placa Petrifilm™ de *E. coli* na empresa responsável pelo abate dos suínos e, posteriormente, conforme a identificação da bactéria, em PCR para identificação do gene da STEC *stx1* e *eaeA* nos Laboratórios de Biologia Molecular e Biotecnologia da Univates.

3.3 Diagnóstico microbiológico para *Escherichia coli* em carcaça de suínos *in natura*

As amostras de swab das carcaças de suínos *in natura* foram coletadas na superfície de animais de diferentes lotes de produtores de suínos estabelecidos no sistema de integração de produtores da empresa, nos meses de março a setembro de 2013. As amostras foram submetidas ao protocolo de extração de DNA por proteinase K (DE GRACIA, 1997) e a reação de PCR, bem como a análise microbiológica. Para a PCR foi utilizado como controle positivo o DNA na concentração de 2×10^{-5} Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

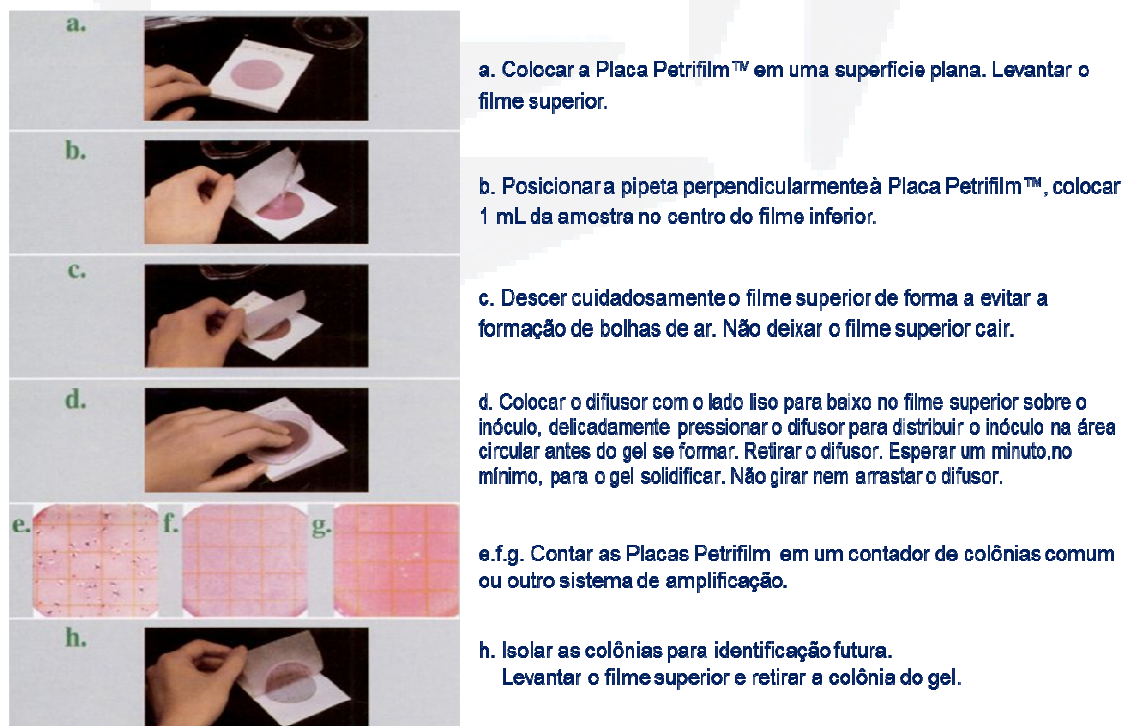
3.4 Preparo da amostra para análise em Placas Petrifilm™

Foi preparada uma diluição 1:10 ou superior da amostra, pesada ou pipetada a amostra num recipiente adequado, como saco para homogeneização, frasco de diluição ou outro recipiente estéril. Adicionou-se a quantidade adequada de um dos

diluentes estéreis a seguir: tampão fosfato de Butterfield, água peptonada 0,1%, diluente salina peptonada (método ISO 6887), água peptonada tamponada (método ISO 6887-1), solução salina (0,85-0,90%), caldo letheen sem bissulfito ou água destilada.

A Placa Petrifilm™ foi colocada em uma superfície plana. Levantado o filme superior e com a pipeta posicionada perpendicularmente à Placa Petrifilm™, foi colocado 1 ml da amostra no centro do filme inferior, conforme ilustra a Figura 6. Cuidadosamente o filme superior foi baixado de forma a evitar a formação de bolhas de ar, não deixando o filme superior cair. Com o lado liso para baixo, foi colocado o difusor no filme superior sobre o inóculo. Delicadamente o difusor foi pressionado para distribuir o inóculo na área circular antes do gel se formar. O difusor não pode ser girado ou arrastado. Após esta etapa foi retirado o difusor, aguardando por um minuto, no mínimo, para o gel solidificar. As placas foram incubadas a 37° C, com a face transparente para cima, em pilhas de até 20 placas. Talvez haja a necessidade de umidificar a estufa para minimizar a perda de umidade (Petrifilm™, 2009).

Figura 6 - Etapas da análise microbiológica em Placa Petrifilm™



Fonte: 3M™ (2009).

As Placas Petrifilm™ foram quantificadas em um contador de colônias comum, foi consultado o Guia de Interpretação para a leitura dos resultados. As colônias foram isoladas para identificação futura, após retirada da colônia do gel (3M™, 2009), conforme imagens indicadas na Figura 6.

O armazenamento das Placas Petrifilm™ contendo as amostras de *E. coli* foi realizado em freezer a temperatura controlada de -20°C no Laboratório de Biotecnologia da Univates.

A análise microbiológica dos swabs de carcaças, coletados no Abatedouro frigorífico, para *E. coli* seguiu o Método Oficial AOAC 991.14, definido para a avaliação em Placas Petrifilm™ em acordo com os parâmetros utilizados pelo laboratório, considerando como parâmetros de análise a incubação em 48h ± 2h a 37°C ± 1°C. (3M™, 2009).

3.5 Extração de DNA das amostras com presença de *Escherichia coli*

Para a extração do DNA utilizou-se o caldo do swab empregado na preparação do Petrifilm™. Em 1 mL de caldo e acrescentou-se 200 µL de Tween 20, seguido de centrifugação a 12000 xg por 10 min a 20°C. Suspendeu-se o sedimento em 300 µL de tampão de lise [60 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl), 30 µL de SDS a 10%, 15 µL de proteinase K (20 mg/mL), 195 µL de água ultra-pura], incubando por 1 h a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se 250 µL de fenol tamponado (pH 8,0) e centrifugado a 12000 xg por 5 min, após a centrifugação transferiu-se 200 µL do sobrenadante para um novo microtubo. Após esse processo, foi adicionado 100 µL de fenol clorofórmio-álcool-isoamílico na proporção de 25:24:1 (centrifugado a 12000 xg por 5 min e transferido 50 µL do sobrenadante para novo microtubo). Acrescentou-se 26,5 µL de acetato de sódio (2 M) e 400 µL de etanol absoluto estocar a -20 °C por 18 horas. Finalmente centrifugou-se a 12.000 xg por 20 min e suspendeu-se o *pellet* com 30 µL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), incubar a 56°C por 15 minutos e estocar a -20°C até o momento da amplificação.

As quantidades de DNA obtida nas extrações foram quantificadas por espectrofotometria (L-Quanti, Loccus Biotecnologia). Para PCR, as amostras foram diluídas em água ultra-pura estéril até a concentração de 0,7 µg/µL de DNA.

Figura 7 – Etapas da extração de DNA por proteinase K

Etapas	Descrição
	Protocolo de extração de DNA por proteinase K (De Gracia, 1997)
Lise das membranas lipídicas	Colocar 200 µL de cada amostra de swab das carcaças ; Acrescentar 20 µL de Tween 20 (adaptado de Serp et al, 1999) Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (Vortex); Centrifugar a 12000 g por 10 min, a temperatura de 20°C; Destacar o sobrenadante por inversão;; Suspender o sedimento em 300 µL de tampão de Lise [60 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl), 30 µL de SDS a 10%, 15 µL de pk 20 mg/mL (degradada endonuclease), 195 µL água pura autoclavada.
Purificação do DNA	Adicionar 250 µL de fenol tamponado; Centrifugar a 12000 g/5 minutos; Transferir 200 µL de sobrenadante a um novo microtubo de 1500 µL ; Adicionar 100 µL de fenol-clorofórmico-álcool-isoamílico (25:24:1); Centrifugar a 12000 g/5 minutos; Transferir 150 µL de sobrenadante para um novo microtubo; Adicionar 26,5 µL de acetato de sódio (2M).
Precipitação do DNA	Adicionar 400 µL de etanol absoluto; Precipitar 18 horas a -20°C; Centrifugar a 12000 g/5 minutos; Descartar o sobrenadante por inversão; Secar o sedimento.
Eluição do DNA	Suspender o sedimento com 30 µL TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0), Incubar a 56°C por 15 minutos; Estocar a -20°C até o momento da amplificação.

Fonte: Do autor (2013).

3.6 Identificação dos genes *stx1* e *eaeA*

Para a genotipagem das amostras positivas para os genes das toxinas Shiga e Intimina, foram utilizados os primers identificados na Figura 8, a seguir.

Figura 8 – Primers para genotipagem das amostras positivas para os genes das toxinas Shiga (*stx1*) e Intimina (*eaeA*)

Gene	Primers
<i>eaeA</i>	GATTTATCTGCATCCCCGTACG CTTACGCTTCAGGCACATACAG
<i>stx1</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG

Fonte: Do autor (2013).

O primer utilizado para a genotipagem do gene *stx1* foi desenhado para este experimento enquanto que do gene *eaeA* foi referenciado na Tese de Mestrado de Caroline Peters Pigatto da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal em São Paulo, denominada Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga (STEC) Isoladas de Bovinos de Corte do Estado do Paraná.

Para as reações foram utilizados 13,85 µL de H₂O, 2,5 µL de PCR Buffer (20 mM de Tris HCL pH 8,4 e 50 mM de KCL), 1,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPmix, 0,5 µM de primers sense e antisense STX1, 0,5 µM de primers sense e antisense *E. coli*, 0,4 µL Taq DNA polimerase, 0,7µg de DNA. As PCR's foram realizadas em termociclador TC-512 (Techne® Barloworld Scientific, Stone, Staffordshire, UK) com um volume final de 20 µL.

As condições da reação da PCR foram as descritas na Figura 9 apresentada abaixo.

Figura 9 – Condições de reação da análise pela PCR

Genes	PCR
<i>eaeA</i> <i>stx1</i>	95°C por 30 segundos 60°C por 1minuto e 30 segundos 72°C por 30 segundos 36 ciclos

Fonte: Do autor (2013).

Para verificação da sensibilidade das reações de PCR, foram testadas curvas de concentração de DNA molde nas seguintes quantidades: 0,1; 1; 10; 100 e 500 ng, para tanto, utilizou-se o DNA do controle positivo.

O fragmento de 231 pb correspondente a *E. coli*, 346 pb correspondente a *stx1*, analisado em gel de agarose na concentração de 1%, corado com Brometo de Etídio e submetido a eletroforese.

Como controle positivo, utilizou-se DNA bacteriano isolado da cepa de *E. coli* O157:H7 Edl 933, gentilmente fornecida pela Prof^a. Dr^a. Caroline Pigatto De Nardi, do Instituto Federal de São Paulo.

3.7 Detecção dos Produtos de PCR

Para a detecção dos produtos da PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM), as eletroforeses foram realizadas em sistema de cubas horizontais, a 60V durante 10 minutos e 100V durante 1,5 horas. Os géis de agarose foram corados em solução de brometo de etídio 0,5µg/mL, visualizados em transiluminador ultravioleta e as imagens registradas com câmera digital.

3.7.1 Expressão dos resultados

Placas Petrifilm™ com 10 a 150 colônias: contar o número de colônias e multiplicar pelo fator de diluição = ao número de microrganismos por grama ou milímetro da amostra analisada (UFC/g).

Placas com mais de 150 colônias: estimar as contagens. Contar o número de colônias em um ou mais quadrados representativos e determinar um número médio. Multiplicar o número médio por 20 para obter a contagem total por placa (devido à área de crescimento circular ser de 20 cm²).

Conforme dados de outro trabalho (VENDRAMIN; BUSTAMANTE FILHO; KICH et al., 2012), ainda não publicado, os limites de detecção de microrganismos a partir da extração para swabs de carcaças de suínos são de 10² UFC/mL pela técnica de PCR individual.

3.7.2 Avaliação estatística dos resultados

Os resultados são descritivos e quantitativos. A ocorrência e prevalência de contaminação bacteriana foi apresentada como média e desvio padrão, e foram comparadas as contaminações nos diferentes pontos da carcaça suína (pernil, barriga, paleta e papada) em diferentes lotes de produtores e horários de abate. Esta foi feita por ANOVA, utilizando o teste Tukey para comparação entre médias. Para análise de sensibilidade e especificidade, foram utilizados os testes Qui-quadrado e teste exato de Fischer. As análises foram feitas através do software Prism 5 (GraphPad, California, EUA), adotando o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises microbiológicas das carcaças

Das coletas realizadas em três abatedouros comerciais, localizados na Região Sul do país nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), 25 (9,19%) foram positivas para presença de *E. coli* de 272 amostras de carcaças suínas coletadas por swab de superfície e analisadas por Placa de Petrifilm™.

Quanto a origem das amostras no que se refere a localização dos abatedouros, a incidência de *E. coli* se manifestou com 20 (16,67%) presenças para as amostras coletadas no RS, 5 (6,58%) presenças para as amostras coletadas no PR e nenhuma presença para as amostras coletadas nas carcaças suínas de SC, conforme informações contidas na Tabela 6.

Tabela 6 - Presença de *E. coli* em carcaças suínas por estado da região sul

UF	Quantidade de Amostras	Presenças	%
RS	120	20	16,67
PR	76	5	6,58
SC	76	0	0,00
Total	272	25	9,19

Fonte: Do autor (2013).

As coletas realizadas em quatro pontos distintos da carcaça (pernil, barriga, paleta e papada) demonstraram resultados diferenciados na identificação da *E. coli*,

sendo a maior incidência ocorrida no ponto denominado papada onde ocorreram 9 (36%) presenças, seguida pelos pontos denominados de pernil e paleta ambos com 6 (24%) presenças e com menor número de positivities se apresentou o ponto denominado de barriga com 4 (16%) presenças na identificação da bactéria pesquisada.

Tabela 7 - Presença de *E. coli* em carcaças suínas por posição na carcaça

Posição na carcaça	Total	%
Papada	9	36
Pernil	6	24
Paleta	6	24
Barriga	4	16
Total	25	100

Fonte: Do autor (2013).

Observando a incidência de *E. coli* nos abatedouros comerciais amostrados nos estados da região sul e relacionando-os com a posição na carcaça suína onde a bactéria se mostrou presente, podemos evidenciar que a maior quantidade está presente na porção da papada do suíno, seguida pelo pernil, paleta e barriga sem distinção significativa entre os pontos, mas com significância para a origem de coleta dos pontos.

Tabela 8 - Presença de *E. coli* em carcaças suínas posição por estado da região sul

Posição na carcaça	RS		PR		SC	
	Qtde.	%	Qtde.	%	Qtde.	%
Papada	7	35	2	40	0	0
Pernil	5	25	1	20	0	0
Paleta	5	25	1	20	0	0
Barriga	3	15	1	20	0	0
Total	20	100	5	100	100	100

Fonte: Do autor (2013).

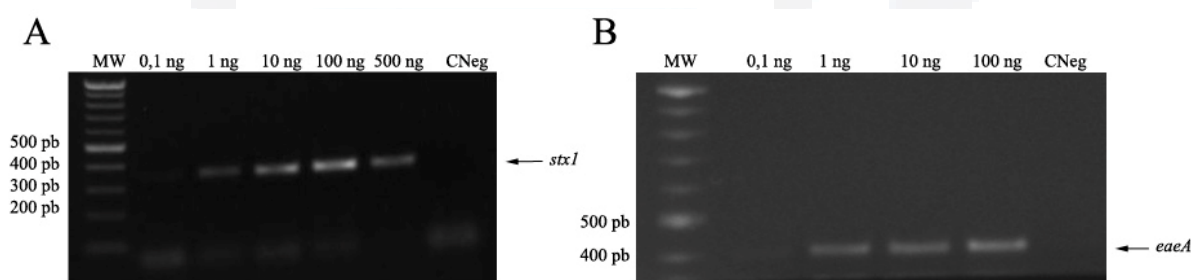
A papada por ser a porção mais baixa da carcaça suína na sua condução durante a evisceração pode estar concentrado o maior número de bactérias, que

podem ser oriundas da manipulação do reto, quando ocluído ou também pela condição do suíno durante o período de espera nas pocilgas, mesmo em dieta hídrica, continuar a fuçar nas fezes presentes no chão e recolher na cavidade da boca resíduos desta matéria orgânica, que no momento da abertura da papada e retirada da língua, antes da retirada da cabeça podem entrar em contato com a parte externa da papada causando a contaminação encontrada nas coletas.

4.2 Identificação dos genes *stx1* e *eaeA*

Para verificar se as amostras positivas para *E. coli* possuíam os genes *stx1* e *eaeA*, o DNA da amostra foi testado por PCR. Para definir a sensibilidade das reações, foram testadas diferentes concentrações de DNA, observando-se que para ambas a quantidades acima de 1 ng de DNA produz amplificação suficiente para detecção em gel de agarose, conforme evidenciado na Figura 10.

Figura 10 - Curva de concentração de DNA na PCR para amplificação dos genes *stx1* (A) e *eaeA* (B). A seta indica o amplicon relativo ao gene, gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio



Fonte: Do autor (2014).

A genotipagem das culturas positivas para *E. coli* não identificou amostras positivas para o gene *stx1*, contudo 13 amostras foram positivas para gene *eaeA*, conforme demonstrado na Figura 11. Com relação as diferentes regiões da carcaça, observou-se a seguinte distribuição de contaminação: papada: cinco ; paleta: quatro; pernil: três e barriga: uma.

Figura 11 – Amostras positivas e negativas para PCR do gene *eaeA* em cultura de *E. coli* de swab de carcaça suína. A seta indica o amplicon relativo ao gene. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio



Fonte: Do autor (2014).

A presença da toxina *eaeA*, nas amostras avaliadas, apresentaram resultados positivos nos quatro pontos distintos da carcaça (pernil, barriga, paleta e papada) com maior incidência no ponto referente a papada com 5 (38,46%) presenças, seguidos pelos pontos da paleta com 4 (30,77%) presenças, pernil com 3 (23,08%) presenças e barriga com apenas 1 (7,69%) presença, conforme Tabela 9, para a toxina *stx1* nenhuma presença foi detectada nas amostras analisadas.

Tabela 9 - Presença de *eaeA* em carcaças suínas por posição na carcaça

Posição na carcaça	Total	%
Papada	5	38,46
Paleta	4	30,77
pernil	3	23,08
Barriga	1	7,69
Total	13	100

Fonte: Do autor (2013).

Os dados demonstram que a ausência de STEC nos suínos abatidos nos estabelecimentos avaliados nos estados do RS, SC e PR, demonstram que a Região Sul do Brasil, não representam uma fonte importante da contaminação das carnes produzidas, por presença desta toxina.

A ausência de STEC nas carcaças suínas positivas para *E. Coli*, demonstrado neste estudo, está em coerência com a pequena quantidade encontrada em outro experimento, onde, Martins, Silva e Dutra et al (2011), observaram a prevalência de

somente 1,35% de STEC em carcaças no Mato Grosso, o que representa uma baixa incidência da toxina em suínos abatidos, também naquela região do país.

O presente estudo demonstra a viabilidade técnica da PCR na genotipagem de isolados de *E. Coli*, pois apesar da ausência de amostras positivas para STEC, salienta-se que *E. coli* produtoras da toxina intimina é frequente em alguns abatedouros, recomendando-se, assim atenção aos controle de contaminação das carcaças abatidas.

5 CONCLUSÃO

Desta forma, os dados encontrados nesta pesquisa, demonstram a ausência de STEC na carcaça de suínos abatidos nos estados do RS, SC e PR.

Contudo, a presença de bactérias produtoras de intimina reforça a necessidade de um maior controle da contaminação das carcaças durante o processo de abate de suínos.

REFERÊNCIAS

3M™ Microbiologia, 3M do Brasil, Petrifilm™™, **Guia de Interpretação**. Brasil, 2009.

ABIEPCS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Relatório Anual 2012**. s/dc. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/uploads/relatorios/relatoriosassociados/ABIEPCS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2014.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Consumo mundial de carne suína**. s/da. Disponível em: <<http://www.abiepcs.org.br/index.php?page=consumo-2>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

_____. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Produção Mundial de carne suína**. s/db. Disponível em: <<http://www.abiepcs.org.br/index.php?page=producao-2>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

ADU-BODIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C. et al. **Intimin α (alpha), β (beta), γ , δ : intimin derivatives expressed by attaching and effacing microtives pathogens** v. 36, p. 662 – 668, 1998.

ANGELES, G. R. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Pública de México**, México D. F., v. 44, n. 5, p. 464 - 475, 2002.

BAD BUG BOOK. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION- FDA/CFSA. *Escherichia coli* O157:H7. In: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (The “Bad Bug Book”). Chap. 15, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): principal virulence factors and epidemiology. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81 - 92, jul., 2007.

BETTS, G.D. Controlling *E. coli* O157. **Nutrition & Food Science**, London, v. 30, n. 4, p. 183-186, 2000.

BEUTIN L. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, 53(7):299 305, 2006.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINHUCK, H. et al. Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2480-2488, Sept., 1993.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Abates de bovinos, suínos e frangos no 3º trimestre foram recordes**. 2013. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=542>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

_____. Ministério da Agricultura, Pequária e Abastecimento – MAPA, Secretaria da Defesa Agropecuária – SIPOA, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, Coordenação Geral de Programas Especiais – CGPE. **Circular 130/2007**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 maio 2013.

_____. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 2011. Disponível em: <http://www.eteavare.com.br/arquivos/20_2177.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2014.

BRETT, K.N.; HORNITZKY, M.A.; BETTELHEIM, K.A. et al. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess Stx2-EDL933 and/or Stx2vhb subtypes. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p.2716-2722, 2002.

BROTAM, M.; GIANELLA, R. A.; ALM, P. F. et al. Conference Statement. ***Escherichia coli* O157:H7 infections-an emerging national health crisis**, July 11 13, 1994. *Gastroenterology*, Duluth, n. 108, p. 1923 1934, 1995.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A. E. **Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe**. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM Press, p. 38 – 47, 1998.

CARDOSO, P.A. **Ocorrência de cepas de *Escherichia coli* que apresentam o gene de Shiga toxina em queijo mussarela produzido artesanalmente**. Dissertação (Mestrado 2009, p. 19-25) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2009.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. **Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence –Associated Genes.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. Desenvolvido pelo Sistema de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo, 2007. **Manual de doenças transmitidas por alimentos e água: *Escherichia coli* O157:H7** – enterohemorrágica (EHEC). Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/manu_va02.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2014.

DOYLE, P. M.; ZHAO, T.; MENG, J. et al. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, P.M.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.** Washington D. C.: ASM Press, p. 171-189, 1977.

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Suínos e Aves. **A suinocultura no Brasil. 2013. Disponível em:** <http://www.cnpas.embrapa.br/cias/index.php?view=article&catid=4%3Asuinos-publico&id=5%3Aorigem-dos-suinos&format=pdf&option=com_content&Itemid=19>. Acesso em: 18 jan. 2014.

FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., GOMYODA, M. Selective isolation of *eae* positive strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1684-87, 2000.

GERMANO, P.M. L; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003.

GRACIA, A. S. de. **Deteção de DNA de *Brucella abortus* em amostras de leite bovino experimentalmente contaminado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR).** 1997, 37. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

GUTH, B. E. C.; RAMOS, S. R. T. S.; CERQUEIRA, A. M. F. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1085-1089, 2002.

HUSSEIN, H.S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of shiga toxinproducing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v. 88, n. 2, p. 450-465, 2005.

HUTTEN, G.; MORAES, I.A. Síndrome Entero-hemorrágica: *Escherichia coli* O157:H7. **SMS-RIO SCZ/Boletim de Divulgação Técnica e Científica**, Rio de Janeiro, ano 2, n. 5, p. 6-7, abr., 2000.

KAPER, J.B.; GANSHEROFF, M.R.W.; O'BRIEN, A.D. Intimin-mediated adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-and-effacing pathogens. In: KAPPER, J.B., O'BRIEN, A.D. ***Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin producing *Escherichia coli* strains**. Washington: ASM PRESS, p. 148-156, 1998.

KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 2, n. 1, p. 15-38, 1989.

KARMALI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, doi: 0.1016/j.vetmic. 2009.04.011, Amsterdam, 2009.

KENSCH, G. T.; ACHECON, D. W. K. Patógenos bacterianos entéricos invasivos e causadores de dano tecidual: diarréia sanguinolenta e disenteria. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia de Doenças Infecciosas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.161-171, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 1466p., 2001.

LAW, D. A. Virulence factor of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E.coli*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 729-745, 2000.

LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M.; ROSA, M. F. de. et al. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in South América. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, p. 30-37, 1998.

MANGIA, A. H. R. *Surto de E. coli Shiga-toxigênica na Alemanha*. Portal ENSP - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca Portal FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, 2011. Disponível em: <<http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/25967>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

MANNING, S. D.; MADERA, R. T.; SCHENEIDER, W. et al. Surveillance for Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Michigan, 2001-2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/EID/content/13/2/318.htm>>. Acesso em: 3 jan. 2014.

MARGALL, N.; DOMÍNGUEZ, A.; PRATS, G. et al. *Escherichia coli* enterohemorrágica. **Revista Espanola de Salud Pública**, Madrid, v. 71, n. 5, p. 437-443, 1997.

MARTINS, R. P.; SILVA, M. C.; DUTRA, V. et al. Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. **Journal Infect Dev Ctries**; The Journal of infection in Developing Countries 5(2):123-126, 2011.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S. et al. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.).

***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains.** Washington, D.C.: ASM, p. 73-81, 1998.

MICKLOS, D.A.; FREYER, G.A.; CROTTY, D.A., **A Ciência do DNA.** 2. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULDINO, J. S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta**, v. 49, n. ss-1, p. 1-62, 2000.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Segurança Básica dos Alimentos para Profissionais da Saúde.** São Paulo, Roca, 2002.

OSWALD, E.; SCHIDT, H.; MORABITO, S. et al. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* : characterization of a new intimin variant. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 64-71, 2000.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Patogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, jul., 1998.

PINTO, A. T.; BERGMAN, G. P. Investigação de Enfermidades Transmitidas por Alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14 n. 74, p. 21-25, out., 2000.

PIRES, E. F. SHINOHARA, N. K. S.; RÊGO, J. C. et al. Surtos de Toxinfecções Alimentares em Unidades de Alimentação e Nutrição. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16 n. 101, p. 20-24, out., 2002.

QUINN, ME; CARTER, ME; MARKEY, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology.** Wolf Publishing: London, p. 648, 1995.

SCOT CONSULTORIA. A crise da suinocultura brasileira. 5. ed., ano 1, jul., 2012. Disponível em: <http://www.scotconsultoria.com.br/cartas/120718_A_crise_da_suinocultura_brasileira_def.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2014.

SHAW, D.J.; JENKINS, C.; PEARCE, M.C. et al. **Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm.** *Appl. Environmental Microbiology*, v.70, p.7456-7465, 2004.

SPIKA, J. S.; KHAKHRIA, R.; MICHEL, P. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canadá. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. ***Escherichia coli***

O157:H7 and other Shiga toxin–producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM Press, p. 23-29, 1998.

STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.M.; NEWLAND, J.W. et al. **Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities.** *Infection and Immunity*, v.53, p.135-140, 1986.

SVS/MS – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. Disponível em: www.portalsaude.gov.br. Acesso em: 18 abr. 2014.

TONI, F. de; SOUZA, E.M. de; KLASSEN, G. et al. Detecção de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *stx*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 73- 77, 2004.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M.B. et al. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VENDRAMIN, T.; BUSTAMANTE FILHO, I.; KICH, D. et al. **Detecção de *Escherichia coli* e da presença de toxinas Shiga (STEC) através de análises microbiológicas e técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em amostras de leite bovino in natura obtidas de rebanhos leiteiros.** Monografia (Faculdade de Biomedicina), Univates, 2012, dados não publicados.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Boletim Técnico – PIE UFES:0147.** Espírito Santo, 2007.

WHO, World Health Organization. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Geneva, Switzerland, 1998.

WILLSHAW, G. A.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R. et al. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a Vero cytotoxinproducing strain of *E. coli* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 897-902, 1994.

YOON, J.W.; HOVDE, C.J. Review - All blood, No stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 9, n. 3, p. 219-231, 2008.

ZHANG, W. L.; KÖHLER, B.; OSWALD, E. et al. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 12, p.4486-4492, 2002.



ANEXOS

ANEXO A – Artigo Publicado

Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal

Print version ISSN 1981 – 2965

Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 08, n. 1, p. 128 - 145, jan-mar, 2014

<http://dx.doi.org/>.

Artigo Científico

Medicina Veterinária

**Prevalência e genotipagem de *Escherichia coli* patogênica em carcaças de suínos
abatidos em frigoríficos comerciais na Região Sul do Brasil**

**Luis Alberto Pereira Machado¹, Franciele Lucca², Jayse Alves³, Adriane Pozzobon⁴,
Ivan Cunha Bustamante-Filho⁵**

RESUMO: A carne suína representa importante fonte de proteína animal para o mundo, porém vem sendo associada a surtos de toxinfecção alimentar. Uma das causas destes surtos é a contaminação por *Escherichia coli*, encontrada no trato intestinal e ambiente dos suínos abatidos para produção de carnes *in natura* e industrializadas. No contexto de segurança alimentar, os surtos por *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são os melhores documentados. Diversos surtos causados por ingestão de alimentos de origem animal foram documentados. Contudo, no Brasil, existem poucos dados sobre a ocorrência deste patógenos em suínos e, consequentemente, na carne de porco. O objetivo deste trabalho foi quantificar a contaminação por *E. coli* de carcaças suínas abatidos em abatedouros comerciais localizados nos estados da Região Sul do Brasil, e identificar por PCR a presença de *E. coli* produtora das toxinas Shiga e Intimina. Foram realizados swabs de 272 carcaças suínas em abatedouros localizados nos estados do RS, SC e PR. Foram identificadas contaminações por *E. coli* em 25 carcaças, sendo 20 no abatedouro do RS e cinco no

abatedouro paranaense. Das amostras positivas foram extraídos DNA para genotipagem por PCR. Nenhuma amostra apresentou o gene *stx1*, porém o gene *eaeA* foi identificado em 13 amostras, nas diferentes regiões da carcaça. A técnica de PCR pode ser uma ferramenta útil no rastreamento da contaminação bacteriana ao longo dos processos do abatedouro, podendo auxiliar na redução da incidência dos casos de toxinfecções alimentares causadas por *E. coli* e outros microorganismos.

Palavras Chaves: Carne suína, *E. coli*, STEC, toxina Shiga, PCR, toxinfecção alimentar.

Prevalence and genotyping of pathogenic *Escherichia coli* on carcasses of pigs slaughtered in commercial slaughterhouses in southern region of Brazil

ABSTRACT: The pork is an important source of animal protein for the world, however it's associated to food poisoning outbreaks. One of the causes of such episodes is the contamination by *Escherichia coli*, that can be found in the intestinal tract and environment of pigs slaughtered for production of “*in natura*” and industrialized meat. In the context of food safety, outbreaks of *Escherichia coli* that producing Shiga toxin (STEC) are the best documented. In the context of food security, outbreaks of *Escherichia coli* Shiga toxin-producing (STEC) are well documented. However, there are few data about the occurrence of this pathogen in swine and pork meat in Brazil. The aim of this study was to quantify contamination by *E. coli* of swine carcass slaughtered in abattoirs located in the Southern region of Brazil and to identify by PCR the presence of shiga toxin and intimin producing *E. coli*. Swabs of 272 swine carcasses were performed in slaughterhouses of RS, SC and PR States. A total of 25 carcasses were contaminated, 20 at RS and 5 at PR. DNA was extracted of positive samples for genotyping by PCR. None of the samples were positive for *stx1* gene, however 13 samples were positive for the *eaeA* gene in different parts of the carcass. The PCR technique can be a useful tool for screening microbiological contamination through

slaughter, helping to reduce the occurrence of foodborne infections outbreaks caused by *E. coli* and other microorganisms.

Key Words: Pork , *E. coli* , STEC , Shiga toxin , PCR , food poisoning

¹ Aluno do Mestrado em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES

² Aluna de Graduação de Biologia do Centro Universitário UNIVATES

³ Aluna de Graduação de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES

⁴ Prof^a. Dr^a. do Mestrado em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES

Coorientadora

⁵ Prof. Dr. do Mestrado em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES –

Orientador

Introdução

A ingestão de alimentos contaminados tem como resultado final os surtos de toxinfecção alimentar, devido, principalmente, a falhas no processo de fabricação, elaboração, conservação, exposição ou consumo de alimentos (Pinto & Bergmann, 2000). A carne suína é um dos alimentos responsáveis por estes surtos, podendo sua origem estar relacionada à presença da *Escherichia coli* (*E. coli*) que é uma bactéria possível de ser encontrada no trato intestinal dos animais

abatidos e utilizados para a produção de carnes *in natura* e industrialização de produtos, como presuntos, salsichas, mortadelas, salames, entre outros (Germano & Germano, 2003; Margall et al., 1997).

O número reduzido de registros de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil prejudica a demonstração estatística dos surtos ocorridos. Dados estatísticos de outros países demonstram o aumento de casos de DTA, principalmente pela oferta de produtos industrializados

com origem em produtos a base de proteína animal. As carnes são consideradas grandes hospedeiros de bactérias patogênicas, entre elas a *E. coli*. Embora os dados demonstrem oscilação e até uma tendência de redução dos surtos nos últimos anos, estes números estão também relacionados com o consumo de carnes contaminadas por *E. coli*, que ocupa o terceiro lugar no país como agente etiológico responsável por surtos alimentares (SVS/MS, 2011).

A *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) é reconhecida como um importante grupo de patógenos emergentes e de elevado grau de infectividade, mesmo em quantidades pequenas (10 UFC). Estas bactérias tem sido o foco de atenção e da captação de informações sobre sua epidemiologia e seus reservatórios, devido ao aumento de ocorrência de surtos alimentares por ela causados em todo o mundo. As estimativas demonstram que, nos Estados Unidos (EUA) a STEC, oriunda da carne bovina,

foi a protagonista de 10.000 a 20.000 episódios anuais de DTA e a responsável por cerca de 200 a 500 óbitos, evidenciados mais frequentemente em crianças e jovens (Brotam et al., 1995).

Soma-se isto ao fato delas estarem direta ou indiretamente ligadas a cadeia alimentar dos seres humanos, responsabilizando-se pela causa de graves doenças ligadas ao consumo de carnes (WHO, 1998). Embora os suínos não sejam considerados uma importante fonte desta toxina, pois sua prevalência é considerada baixa nesta espécie (Fairbrother & Nadeau, 2006), a STEC já foi isolada em carne suína e produtos derivados envolvidos em infecções de seres humanos (Bouvet et al., 2002).

A capacidade da STEC de causar doenças graves está relacionada com a produção de um ou mais tipos de toxina Shiga (*stx1*, *stx2* ou variantes), sua presença além de atuar como fontes de contaminação dos animais pode também causar contaminações através de presença

de fezes (Gyles, 2007) podendo disseminá-la nos abatedouros (Bouvet et al., 2002).

Meng et al. (1998) demonstraram a direta relação entre a presença do gene *eae* e a capacidade da STEC em causar doenças graves nos seres humanos. O gene *eae* codifica a proteína externa de membrana Intimina um fator de virulência mediador no ataque ao enterócito. Produz uma lesão intestinal do tipo “attaching and effacing” (AE); “attaching” que indica íntima adesão ao enterócito e “effacing”, desaparecimento das microvilosidades da borda em escova do epitélio intestinal (Willshaw et al., 1994, China et al., 1996). Em humanos, STEC *eae* positivos estão relacionados a quadros severos de diarreia, principalmente Colite Hemorrágica (HC) e Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU) (Karmali, 1989; Paton & Paton, 1998).

A partir do relato de surto causado por STEC no ano de 1982, a linhagem foi associada a um amplo espectro de doenças no ser humano, variando de diarreia branda a complicações graves como a SHU

(Nataro & Kaper, 1998), sendo este agente, considerado como a principal causa da insuficiência renal aguda em crianças nos EUA (Kensh & Achecon, 2002).

Os casos de diarreia por STEC excederam 2% em países como Alemanha, Noruega, Suíça e Áustria, enquanto que na Itália foi menor que 1%, sendo que a maior incidência de SHU no continente Europeu está na Alemanha com 19 casos para cada 100.000 crianças até 15 anos (Caprioli & Tozzi, 1998). O Canadá em 1991 foi registrado o maior surto de infecção por STEC já ocorrido no mundo, onde foram notificados 521 casos entre os esquimós, sendo 22 casos de SHU e duas mortes (Spika et al., 1998). No Japão, entre 1991 a 1995, ocorreram 29 surtos provocados por *E. coli*, dos quais quatro destes surtos ocorreram em jardins de infância, seis ocorreram em escolas primárias e 19 ocorreram entre familiares (Michino et al., 1998). Em Michigan, nos EUA, foi realizado estudo das STEC isoladas entre 2000 e 2005, onde foram avaliados mais de

389 pacientes com STEC, com diarreia sanguinolenta ou SHU (Manning et al., 2007).

A maior incidência de SHU em crianças de até quatro anos, nos últimos 30 anos, foi apontada na Argentina, onde os casos de SHU ocorridos apresentam-se de 7 a 10 vezes mais altos do que os relatados em outras partes do mundo. Na Argentina 80% da carne consumida não passa por controles e inspeção adequada, o que justifica a alta incidência de infecções por STEC (Lopez et al., 1998).

No Brasil são poucas as informações disponíveis sobre o assunto, embora sejam reconhecidos casos esporádicos de diarreia provocados pela STEC que ocorrem com mais frequência em crianças (Paton & Paton, 1998), estudos realizados em São Paulo e no Paraná utilizando fezes de crianças com diarreia apontam frequência de STEC de aproximadamente 1%. Surtos associados à STEC ainda não foram confirmados no país (Guth et al., 2002; Toni et al., 2004).

A emergência deste patógeno gerou grande preocupação mundial, pelo número de pessoas afetadas e por distintos veículos de transmissão identificados (ressaltando produtos de origem animal), o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a promover medidas de controle e prevenção. Contudo a identificação de STEC é feito principalmente pela imunodeteção das toxinas nos isolados, técnica laboriosa e demorada (Gyles, 2007). Assim, novos métodos vem sendo buscados para rápida identificação do patógeno.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos principais métodos moleculares utilizados para detecção de STEC (Park et al., 1999), apresentando como vantagens a especificidade e sensibilidade bem como a rapidez na sua execução da técnica (Paton & Paton, 1998). A desvantagem está na presença de inibidores da reação presentes na própria amostra e a facilidade de contaminação durante o processo (Brian et al., 1992).

O objetivo deste trabalho foi identificar a contaminação de carcaças suínas abatidas em abatedouros frigoríficos comerciais localizados nos estados que compõem a Região Sul do país - Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR) pela presença de STEC e Intiminas, através da detecção por PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Amostras

As amostras de *swabs* de carcaça de suínos (n=272) foram coletadas em três abatedouros frigoríficos comerciais localizados nos estados do RS, SC e PR. A obtenção das amostras ocorreu nos meses de março a setembro de 2013, considerando as normas de higiene e segurança dos alimentos em processo normal de abate de suínos destes estabelecimentos. O recolhimento amostral foi realizado seguindo a norma de coleta e acondicionamento de amostras definida pela Circular N° 130 de 2007 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo os swabs

preparados e analisados microbiologicamente para *E.coli* em Placa Petrifilm™ e posteriormente, sua identificação realizada por PCR.

Para estimar a prevalência da STEC, o tamanho adequado de amostra estatisticamente foi calculado com base no número de animais abatidos (980.000 por ano) nestes estabelecimentos, numa prevalência esperada de 5%, em nível de confiança de 95% e para uma precisão de 5%, utilizando o Win Episcopo 2.0 (Universidad de Zaragoza, Espanha). Desta forma, as amostras foram constituídas aleatoriamente de 30 carcaças de suínos para o estabelecimento do RS e 19 para os estabelecimentos de SC e PR, obtidas aleatoriamente em diversos dias e horários de coleta. As amostras de swabs superficiais de carcaças foram coletadas em quatro pontos distintos da carcaça (pernil, barriga, paleta e papada) no mesmo ponto no frigorífico, após o Ponto Crítico de Controle Biológico (PCCB), totalizando

120 amostras para a coleta de 30 carcaças e 76 para as coletas de 19 carcaças.

A área amostrada para coleta na superfície das carcaças foi delimitada por molde estéril de aço inox com área interna livre de 10 cm² por ponto de coleta, onde foram efetuados os esfregaços com uso de *swabs*, devidamente esterilizados e previamente umedecidos em solução fisiológica peptonada 0,1 %.

Diagnostico microbiológico para *E. coli*

As amostras foram submetidas ao protocolo de extração de DNA por proteinase K (De Gracia, 1997) e por PCR para identificação microbiológica. Para a PCR foi utilizado como controle positivo o DNA na concentração de 2×10^{-5} Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE

EM PLACAS PETRIFILM™

A amostra em *swab* foi preparada numa diluição de 1:10 ou superior da amostra em recipiente estéril. Foi adicionada a quantidade adequada de um dos diluentes estéreis a seguir: tampão

fosfato de Butterfield, água peptonada 0,1%, diluente salina peptonada (método ISO 6887), água peptonada tamponada (método ISO 6887-1), solução salina (0,85-0,90%), caldo letheen sem bissulfito ou água destilada. O ensaio na placa Placa Petrifilm™ seguiu as recomendações do fabricante. As placas foram incubadas a 37° C, com a face transparente para cima, em pilhas de até 20 placas (3M™ Petrifilm™, Brasil), sendo quantificadas em um contador de colônias comum.

EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS

Para a extração do DNA utilizou-se o caldo do swab empregado na preparação do petrifilm (adaptado de De Gracia, 1997). Em 200 µL de caldo e acrescentou-se 20 µL de Tween 20, seguido de centrifugação a 12000 x g por 10 min a 20°C. Suspendeu-se o sedimento em 300 µL de tampão de lise [60 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl), 30 µL de SDS a 10%, 15 µL de proteinase K (20 mg/mL), 195 µL de água ultra-pura], incubando por

1 h a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se 250 µL de fenol tamponado (pH 8,0) e centrifugado a 12.000 x g por 5 min, após a centrifugação transferiu-se 200 µL do sobrenadante para um novo microtubo. Após esse processo, foi adicionado 100 µL de fenol clorofórmio-álcool-isoamílico na proporção de 25:24:1 (centrifugado a 12000 x g por 5 min e novamente passado 150 µL do sobrenadante para um novo microtubo). Acrescentou-se 26,5 µL de acetato de sódio (2 M) e 400 µL de etanol absoluto estocar a -20 °C por 18 horas. Finalmente centrifugou-se a 12.000 x g por 20 min e suspendeu-se o *pellet* com 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Após incubação a 56°C por 15 minutos, o DNA purificado foi estocado a -20°C até o momento da PCR.

As quantidades de DNA obtida nas extrações foram quantificadas por espectrofotometria (L-Quanti, Locus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Para PCR, as amostras foram diluídas em água ultra-pura estéril até a concentração de 0,7

µg/µL de DNA.

IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *STX1* E *EAE*

Para a genotipagem das amostras positivas para os genes das toxinas Shiga e Intimina, foram utilizados os seguintes primers: gene *stx1* (GI: 356892774) *stx1*-F 5'GATTTATCTGCATCCCCGTACG3' e *stx1*-R 5'CTTACGCTTCAGGCACATACAG3'; gene *eaeA*: *eaeA*-F 5'GACCCGGCACAAGCATAAGC3' e *eaeA*-R 5'CCACCTGCAGCAACAAGAGG3' (Paton & Paton, 2002). Para as reações foram utilizados 13,85µL de H₂O, 2,5µL de PCR Buffer (20 mM de Tris HCl pH 8,4 e 50mM de KCl), 1,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPmix, 0,5 µM de primers sense e antisense STX1, 0,5 µM de primers sense e antisense *E. coli*, 0,4µL Taq DNA polimerase, 0,7µg de DNA. As PCR's foram realizadas em termociclador TC-512 (Techne® Barloworld Scientific, Stone, Staffordshire, UK) com um volume final de 20 µL. As condições da reação da PCR foram: desnaturação a 95 °C por 30

segundos, anelamento por 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, durante 36 ciclos. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%, corado com Brometo de Etídio. Como controle positivo, utilizou-se DNA bacteriano isolado da cepa de *E. coli* O157:H7 Edl 933, gentilmente fornecida pela Prof^a. Dr^a. Caroline Pigatto De Nardi, do Instituto Federal de São Paulo.

Para verificação da sensibilidade das reações de PCR, foram testadas curvas de concentração de DNA molde nas seguintes quantidades: 0,1; 1; 10; 100 e 500 ng. Para tanto, utilizou-se o DNA do controle positivo.

Resultados e Discussão

Das 272 amostras de carcaças suínas coletadas por swab de superfície e analisadas para presença de *E. coli*, 25 (9,19%) foram positivas.

A incidência de *E. coli* se manifestou com 20 (16,67%) presenças para as amostras do RS, 5 (6,58%)

presenças para as amostras do PR, não ocorrendo contaminação das amostras coletadas nas carcaças suínas de SC.

As coletas realizadas em quatro pontos distintos da carcaça (pernil, barriga, paleta e papada) demonstraram resultados diferenciados na identificação da *E. coli*, sendo que a maior incidência ocorreu na papada com 9 (36%) presenças, seguida pelos pontos de pernil e paleta ambos com 6 (24%) presenças e por último a barriga com 4 (16%) presenças para a bactéria pesquisada.

Para verificar se as amostras positivas para *E. coli* possuíam os genes *stx1* e *eaeA*, o DNA da amostra foi testado por PCR. Para definir a sensibilidade das reações, foram testadas diferentes concentrações de DNA, observando-se que para ambas as quantidades acima de 1 ng de DNA produz amplificação suficiente para detecção em gel de agarose (Figura 1).

A genotipagem das culturas positivas para *E. coli* não identificou amostras positivas para o gene *stx1*,

contudo 13 amostras foram positivas para gene *eaeA* (Figura 2). Com relação as diferentes regiões da carcaça, observou-se a seguinte distribuição de contaminação: papada: cinco; paleta: quatro; pernil: três e barriga: uma.

A ausência de carcaças suínas portadoras de STEC demonstrado neste estudo está de acordo a baixa incidência relatada em outros estudos. Leung et al. (2001) relataram a presença de STEC em 2,1% dos suínos abatidos em Hong Kong. Porto et al. (2008) observaram a ausência de STEC em amostras fecais de granjas de suínos na Espanha, Bonardi et al. (2003) e Heuvelink et al. (1999) detectaram a ocorrência de STEC em 0,7% dos suínos abatidos em matadouros ambos da Itália e Holanda. No Brasil, Martins et al. (2011), observou a prevalência de 1,35% de STEC em carcaças no Mato Grosso, o que concorda com a baixa incidência da toxina em suínos observada na literatura.

O presente estudo demonstra a viabilidade técnica da PCR na

genotipagem de isolados de *E. coli*. Apesar da não ocorrência de amostras positivas para STEC, salienta-se que *E. coli* produtoras da toxina intimina é frequente em alguns abatedouros, recomendando-se, assim, um maior cuidado com relação ao controle de contaminação das carcaças e cortes suínos durante a linha de abate.

Conclusão

Deste forma, os dados encontrados demonstram a ausência de STEC na carcaça de suínos abatidos em abatedouros dos estados do RS, SC e PR. Contudo, a presença de bactérias produtoras de intimina reforça a necessidade de um maior controle da contaminação das carcaças durante o abate de suínos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUVET J., BAVAI C., ROSSEL R., LE ROUX A., MONTET M.P., RAYGUENIOT S., MAZUY C., ATRACHE V., VERNIZY-ROZAND C. Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli*

- O157:H7. International Journal of Food Microbiology, 77: 91-97, 2002.
- BOUVET J., MONTET M.P., ROSSEL R., LE ROUX A., BAVAI C., RAYGUENIOT S., MAZUY C., ATRACHE V., VERNOSY-ROZAND C. Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. International Journal of Food Microbiology, 77: 99-108, 2002.
- BONARDI S., BRINDANI F., PIZZIN, G., LUCIDI L., D'INCAU M., LIEBANA E., MORABITO, S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. International Journal of Food Microbiology 85: 101-110, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pequária e Abastecimento – MAPA, Secretaria da Defesa Agropecuária – SIPOA, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, Coordenação Geral de Programas Especiais – CGPE, Circular 130/2007. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 20 dez 2013.
- BRIAN, M. J.; FROSLONO, M.; MURRAY, B. E.; MIRANDA, A.; LOPEZ, E. L.; GOMEZ, H. F.; CLEARLY, T. G. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 30, n. 1, p.1801-1806, 1992.
- BROTAM, M.; GIANELLA, R. A.; ALM, P. F.; BAUMAN, H.; BENNETT, A. R.; BLACK, R. E.; BRUHN, C. M.; COHEN, M. B.; GORBACH, S. L.; KAPER, J. B.; ROBERTS, M. R.; STANECK, J. L.; TAYLOR, S.; TROUTT, H. F.; BELL, B. P.; BUCHANAN, R. L.; DURHAM, K.; FENG, P.; FOREMAN, C. T.; GALLER, R. G.; GRAVANI, R. B.; HALL, R. H.; HANCOCK, D. D.; HOLLINGSWORTH, J. Consensus Conference Statement. *Escherichia coli*

- O157:H7 infections-an emerging national health crisis, July 11-13, 1994. *Gastroenterology*, Duluth, n. 108, p. 1923-1934, 1995.
- CAPRIOLI, A.; TOZZI, A. E. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 38-47
- CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence –Associated Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.
- DE GRACIA, A. S. Detecção de DNA de *Brucella abortus* em amostras de leite bovino experimentalmente contaminado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 1997.
- FAIRBROTHER, J.M. and NADEAEU, É. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Science Technology*, 25: 555-569, 2006.
- GERMANO, P.M. L; GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 655 p.v.
- GUTH, B. E. C.; RAMOS, S. R. T. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; ANDRADE, J. R. C.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1085-1089, 2002.
- GYLES C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal Animal Science*, 85: E45-E62, 2007.
- HEUVELINK, A.E., ZWARTKRUIS-NAHUIS J.T.M., VAN DEN BIGGELAAR F.L.A.M., VAN LEEUWEN, W.J., DE BOER, E. Isolation

- and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 67-75, 1999.
- KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, New York, v. 19, n. 1, p. 619-20, Mar. 1983.
- KENSCH, G. T.; ACHECON, D. W. K. Patógenos bacterianos entéricos invasivos e causadores de dano tecidual: diarreia sanguinolenta e disenteria. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *Microbiologia de Doenças Infecciosas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.161-171.
- LEUNG P.H.M., YAM W.C., NG W.W.S., PEIRIS J.S.M. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. *Epidemiol Infect* 126: 173-179, 2001.
- LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M.; DE ROSA, M. F. Epidemiology of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* infections in South América. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 30-37.
- MANNING, S. D.; MADERA, R. T.; SCHENEIDER, W.; DIETRICH, S. E.; KHALIFE, W.; BROWN, W.; WHITTAM, T. S.; SOMSEL, P.; RUDRIK, J. T. Surveillance for Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Michigan, 2001-2005. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n .2, 2007, disponível em <http://www.cdc.gov/EID/content/13/2/318.htm>> Acesso em: 3 de jan. de 2014.
- MARGALL, N.; DOMÍNGUEZ, A.; PRATS, G.; SALLERAS, L. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista Espanola de Salud Pública*, Madrid, v.71, n.5, p.437-443, 1997.

- MARTINS, R. P., SILVA, M. C., DUTRA, V., NAKAZATO, L., LEITE, D. S., Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. *J Infect Dev Ctries*; 5(2):123-126, 2011.
- MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Review: Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, v.5, n.6, p.179-185, 1998.
- MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; NAKAYAMA, T.; EJIMA, Y.; HIROE, K.; TANAKA, H.; FUJITA, N.; USAMI, S.; YONEKAWA, M.; SADAMOTO, K.; TAKAYA, S.; SAKAI, N. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM, 1998. p. 73-81.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- PORTO B., ESTEBAN J.I., ADURIZ G., JUSTE R.A., HURTADO A. *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in Healthy Cattle, Sheep and Swine Herds in Northern Spain. *Zoonoses Public Health*, 55: 73-81, 2008.
- PARK, S.; WAROBO, R. W.; DURST, R. A. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1999.
- PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, Jul. 1998.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, p. 271-274, 2002.

- PINTO, A. T.; BERGMAN, G. P. Investigação de Enfermidades Transmitidas por Alimentos. Higiene Alimentar, São Paulo, V.14 nº 74, pg 21-25, out. 2000.
- SPIKA, J. S.; KHAKHRIA, R.; MICHEL, P.; MILLEY, D.; WILSON, J.; WATERS, J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canadá. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 23-29.
- SVS/MS – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. Disponível em: www.portalsaude.gov.br. Acesso em: 19 dez 2013.
- TONI, F. de; SOUZA, E.M. de; KLASSEN, G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, C. R. da; PICHETH, G.; FARAH, S. M. S. S.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Detecção de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) através da amplificação dos genes *stx*. Revista Brasileira de Análises Clínicas, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 73- 77, 2004.
- WHO, World Health Organization. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Geneva, Switzerland, 1998.
- WILLSHAW, G. A.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; THOMAS, A.; ROWE, B. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a Vero cytotoxinproducing strain of *E. coli* O157. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 32, n. 4, p. 897-902, 1994.
- 3M™ Microbiologia, 3M do Brasil, Petrifilm™™, Guia de Interpretação, Brasil 2009. Disponível em: <http://www.multimedia.3m.com>. Acesso em: 16 jan. 2013.

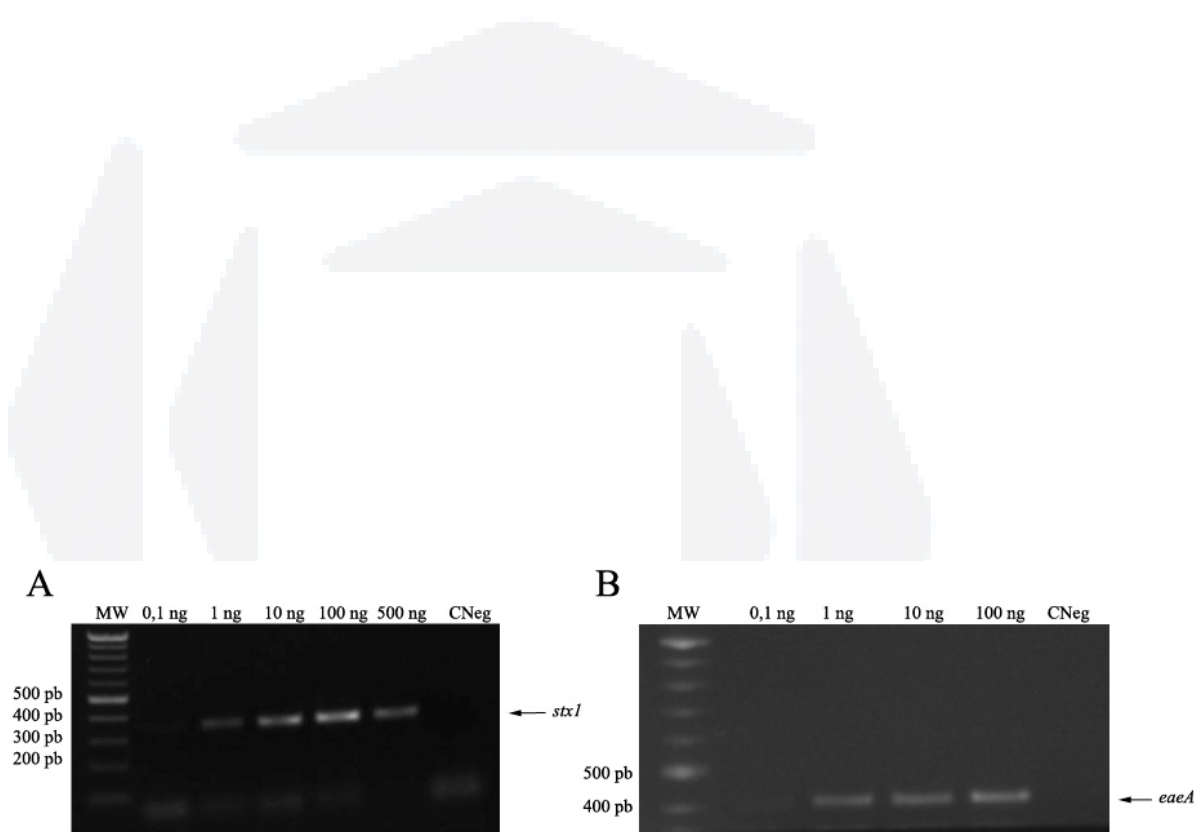


Figura 1 - Curva de concentração de DNA na PCR para amplificação dos genes *stxI* (A) e *eaeA* (B). A seta indica o amplicon relativo ao gene, gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.



Figura 2 – Amostras positivas e negativas para PCR do gene *eaeA* em cultura de *E. coli* de swab de carcaça suína. A seta indica o amplicon relativo ao gene. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

ANEXO B – Coleta de dados

COLETAS DE SWAB DE MEIA CARCAÇA PARA ANÁLISE – PR								
N°	Coleta	Data	Horário	Posição Swab	Região	Padrão	Resultado	Resultado Escherichi a coli (UFC/cm ²)
1	1	14/08/2013	08:00:00	Pernil	Toledo	ausência	ausência	0
2	1	14/08/2013	08:00:00	Barriga	Toledo	ausência	ausência	0
3	1	14/08/2013	08:00:00	Paleta	Toledo	ausência	ausência	0
4	1	14/08/2013	08:00:00	Papada	Toledo	ausência	ausência	0
5	2	14/08/2013	10:00:00	Pernil	Toledo	ausência	ausência	0
6	2	14/08/2013	10:00:00	Barriga	Toledo	ausência	ausência	0
7	2	15/08/2013	11:00:00	Paleta	Toledo	ausência	ausência	0
8	2	16/08/2013	12:00:00	Papada	Toledo	ausência	ausência	0
9	3	14/08/2013	15:20:00	Pernil	Capanema	ausência	ausência	0
10	3	14/08/2013	15:20:00	Barriga	Capanema	ausência	ausência	0
11	3	14/08/2013	15:20:00	Paleta	Capanema	ausência	ausência	0
12	3	14/08/2013	15:20:00	Papada	Capanema	ausência	ausência	0
13	4	15/08/2013	06:30:00	Pernil	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
14	4	15/08/2013	06:30:00	Barriga	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
15	4	15/08/2013	06:30:00	Paleta	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
16	4	15/08/2013	06:30:00	Papada	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
17	5	15/08/2013	08:00:00	Pernil	Maripá	ausência	ausência	0
18	5	15/08/2013	08:00:00	Paleta	Maripá	ausência	ausência	0
19	5	15/08/2013	08:00:00	Barriga	Maripá	ausência	ausência	0
20	5	15/08/2013	08:00:00	Papada	Maripá	ausência	ausência	0
21	6	15/08/2013	09:00:00	Pernil	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
22	6	15/08/2013	09:00:00	Barriga	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
23	6	15/08/2013	09:00:00	Papada	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
24	6	15/08/2013	09:00:00	Paleta	Entre Rios do Oeste	ausência	ausência	0
25	7	15/08/2013	12:40:00	Pernil	Toledo	ausência	ausência	0
26	7	15/08/2013	12:40:00	Barriga	Toledo	ausência	ausência	0
27	7	15/08/2013	12:40:00	Paleta	Toledo	ausência	ausência	0
28	7	15/08/2013	12:40:00	Papada	Toledo	ausência	ausência	0
29	8	16/08/2013	06:30:00	Pernil	Medianeira	ausência	ausência	0
30	8	16/08/2013	06:30:00	Barriga	Medianeira	ausência	ausência	0
31	8	16/08/2013	06:30:00	Paleta	Medianeira	ausência	ausência	0
32	8	16/08/2013	06:30:00	Papada	Medianeira	ausência	presença	0,5
33	9	16/08/2013	08:30:00	Pernil	Pato Bragado	ausência	ausência	0

34	9	16/08/2013	08:30:00	Barriga	Pato Bragado	ausência	ausência	0
35	9	16/08/2013	08:30:00	Paleta	Pato Bragado	ausência	ausência	0
36	9	16/08/2013	08:30:00	Papada	Pato Bragado	ausência	ausência	0
37	11	16/08/2013	11:00:00	Pernil	Toledo	ausência	ausência	0
38	11	16/08/2013	11:00:00	Barriga	Toledo	ausência	ausência	0
39	11	16/08/2013	11:00:00	Paleta	Toledo	ausência	ausência	0
40	11	16/08/2013	11:00:00	Papada	Toledo	ausência	ausência	0
41	10	09/09/2013	00/01/19 00	Pernil	Toledo	ausência	ausência	0
42	10	09/09/2013	08:40:00	Barriga	Toledo	ausência	presença	5
43	10	09/09/2013	00/01/19 00	Paleta	Toledo	ausência	ausência	0
44	10	09/09/2013	00/01/19 00	Papada	Toledo	ausência	ausência	0
45	12	16/08/2013	11:50:00	Pernil	Marechal Cdo. Rondon	ausência	ausência	0
46	12	16/08/2013	11:50:00	Paleta	Marechal Cdo. Rondon	ausência	presença	0,5
47	12	16/08/2013	11:50:00	Barriga	Marechal Cdo. Rondon	ausência	ausência	0
48	12	16/08/2013	11:50:00	Papada	Marechal Cdo. Rondon	ausência	ausência	0
49	13	16/08/2013	12:35:00	Pernil	Marechal Cdo. Rondon	ausência	ausência	0
50	13	16/08/2013	12:35:00	Paleta	Marechal Cdo. Rondon	ausência	ausência	0
51	13	16/08/2013	12:35:00	Barriga	Marechal Cdo. Rondon	ausência	ausência	0
52	13	16/08/2013	12:35:00	Papada	Marechal Cdo. Rondon	ausência	ausência	0
53	14	16/08/2013	12:50:00	Pernil	São Pedro do Iguaçu	ausência	ausência	0
54	14	16/08/2013	12:50:00	Barriga	São Pedro do Iguaçu	ausência	ausência	0
55	14	16/08/2013	12:50:00	Paleta	São Pedro do Iguaçu	ausência	ausência	0
56	14	16/08/2013	12:50:00	Papada	São Pedro do Iguaçu	ausência	ausência	0
57	15	19/08/2013	08:00:00	Pernil	Santa Helena	ausência	ausência	0
58	15	19/08/2013	08:00:00	Barriga	Santa Helena	ausência	ausência	0
59	15	19/08/2013	08:00:00	Paleta	Santa Helena	ausência	ausência	0
60	15	19/08/2013	08:00:00	Papada	Santa Helena	ausência	ausência	0
61	16	19/08/2013	10:00:00	Pernil	Três barras do Paraná	ausência	ausência	0
62	16	19/08/2013	10:00:00	Barriga	Três barras do Paraná	ausência	ausência	0
63	16	19/08/2013	10:00:00	Paleta	Três barras do Paraná	ausência	ausência	0
64	16	19/08/2013	10:00:00	Papada	Três barras do Paraná	ausência	ausência	0
65	17	19/08/2013	12:30:00	Pernil	Maripa	ausência	presença	1
66	17	19/08/2013	12:30:00	Barriga	Maripa	ausência	ausência	0
67	17	19/08/2013	12:30:00	Paleta	Maripa	ausência	ausência	0
68	17	19/08/2013	12:30:00	Papada	Maripa	ausência	ausência	0
69	18	20/08/2013	07:46:00	Pernil	Toledo	ausência	ausência	0

70	18	20/08/2013	07:46:00	Barriga	Toledo	ausência	ausência	0
71	18	20/08/2013	07:46:00	Paleta	Toledo	ausência	ausência	0
72	18	20/08/2013	07:46:00	Papada	Toledo	ausência	ausência	0
73	19	20/08/2013	10:33:00	Pernil	Toledo	ausência	ausência	0
74	19	20/08/2013	10:33:00	Barriga	Toledo	ausência	ausência	0
75	19	20/08/2013	10:33:00	Paleta	Toledo	ausência	ausência	0
76	19	20/08/2013	10:33:00	Papada	Toledo	ausência	presença	3,5

COLETAS DE SWAB DE MEIA CARCAÇA PARA ANÁLISE - SC								
Nº	Coleta	Data	Horário	Posição Swab	Região	Padrão	Resultado	Resultado Escherichi a coli (UFC/cm²)
1	1	07/08/2013	07:00:00	Pernil	Campos Novos	ausência	ausência	0
2	1	07/08/2013	07:00:00	Barriga	Campos Novos	ausência	ausência	0
3	1	07/08/2013	07:00:00	Paleta	Campos Novos	ausência	ausência	0
4	1	07/08/2013	07:00:00	Papada	Campos Novos	ausência	ausência	0
5	1	07/08/2013	10:00:00	Pernil	Campos Novos	ausência	ausência	0
6	1	07/08/2013	10:00:00	Barriga	Campos Novos	ausência	ausência	0
7	1	07/08/2013	10:00:00	Paleta	Campos Novos	ausência	ausência	0
8	1	07/08/2013	10:00:00	Papada	Campos Novos	ausência	ausência	0
9	2	08/08/2013	15:30:00	Pernil	Tangará	ausência	ausência	0
10	2	08/08/2013	13:30:00	Barriga	Tangará	ausência	ausência	0
11	2	08/08/2013	13:30:00	Paleta	Tangará	ausência	ausência	0
12	2	08/08/2013	13:30:00	Papada	Tangará	ausência	ausência	0
13	3	09/08/2013	06:00:00	Pernil	Concórdia	ausência	ausência	0
14	3	09/08/2013	06:00:00	Barriga	Concórdia	ausência	ausência	0
15	3	09/08/2013	06:00:00	Paleta	Concórdia	ausência	ausência	0
16	3	09/08/2013	06:00:00	Papada	Concórdia	ausência	ausência	0
17	3	09/08/2013	08:00:00	Pernil	Concórdia	ausência	ausência	0
18	3	09/08/2013	08:00:00	Barriga	Concórdia	ausência	ausência	0
19	3	09/08/2013	08:00:00	Paleta	Concórdia	ausência	ausência	0
20	3	09/08/2013	08:00:00	Papada	Concórdia	ausência	ausência	0
21	3	09/08/2013	09:00:00	Pernil	Concórdia	ausência	ausência	0
22	3	09/08/2013	09:00:00	Barriga	Concórdia	ausência	ausência	0
23	3	09/08/2013	09:00:00	Paleta	Concórdia	ausência	ausência	0
24	3	09/08/2013	09:00:00	Papada	Concórdia	ausência	ausência	0
25	4	10/08/2013	12:00:00	Pernil	Concórdia	ausência	ausência	0
26	4	10/08/2013	12:00:00	Barriga	Concórdia	ausência	ausência	0

27	4	10/08/2013	12:00:00	Paleta	Concórdia	ausência	ausência	0
28	4	10/08/2013	12:00:00	Papada	Concórdia	ausência	ausência	0
29	4	10/08/2013	07:00:00	Pernil	Concórdia	ausência	ausência	0
30	4	10/08/2013	07:00:00	Barriga	Concórdia	ausência	ausência	0
31	4	10/08/2013	07:00:00	Paleta	Concórdia	ausência	ausência	0
32	4	10/08/2013	07:00:00	Papada	Concórdia	ausência	ausência	0
33	5	13/08/2013	08:00:00	Pernil	Rio das Antas	ausência	ausência	0
34	5	13/08/2013	08:00:00	Barriga	Rio das Antas	ausência	ausência	0
35	5	13/08/2013	08:00:00	Paleta	Rio das Antas	ausência	ausência	0
36	5	13/08/2013	08:00:00	Papada	Rio das Antas	ausência	ausência	0
37	5	13/08/2013	11:00:00	Pernil	Rio das Antas	ausência	ausência	0
38	5	13/08/2013	11:00:00	Barriga	Rio das Antas	ausência	ausência	0
39	5	13/08/2013	11:00:00	Paleta	Rio das Antas	ausência	ausência	0
40	5	13/08/2013	11:00:00	Papada	Rio das Antas	ausência	ausência	0
41	6	14/09/2013	09:00:00	Pernil	Campos Novos	ausência	ausência	0
42	6	14/09/2013	09:00:00	Barriga	Campos Novos	ausência	ausência	0
43	6	14/09/2013	09:00:00	Paleta	Campos Novos	ausência	ausência	0
44	6	14/09/2013	09:00:00	Papada	Campos Novos	ausência	ausência	0
45	7	15/08/2013	08:00:00	Pernil	Videira	ausência	ausência	0
46	7	15/08/2013	08:00:00	Barriga	Videira	ausência	ausência	0
47	7	15/08/2013	08:00:00	Paleta	Videira	ausência	ausência	0
48	7	15/08/2013	08:00:00	Papada	Videira	ausência	ausência	0
49	7	15/08/2013	12:00:00	Pernil	Videira	ausência	ausência	0
50	7	15/08/2013	12:00:00	Barriga	Videira	ausência	ausência	0
51	7	15/08/2013	12:00:00	Paleta	Videira	ausência	ausência	0
52	7	15/08/2013	12:00:00	Papada	Videira	ausência	ausência	0
53	7	15/08/2013	14:00:00	Pernil	Videira	ausência	ausência	0
54	7	15/08/2013	14:00:00	Barriga	Videira	ausência	ausência	0
55	7	15/08/2013	14:00:00	Paleta	Videira	ausência	ausência	0
56	7	15/08/2013	14:00:00	Papada	Videira	ausência	ausência	0
57	8	17/08/2013	08:00:00	Pernil	Tangará	ausência	ausência	0
58	8	17/08/2013	08:00:00	Barriga	Tangará	ausência	ausência	0
59	8	17/08/2013	08:00:00	Paleta	Tangará	ausência	ausência	0
60	8	17/08/2013	08:00:00	Papada	Tangará	ausência	ausência	0
61	8	17/08/2013	10:00:00	Pernil	Rio das Antas	ausência	ausência	0
62	8	17/08/2013	10:00:00	Barriga	Rio das Antas	ausência	ausência	0
63	8	17/08/2013	10:00:00	Paleta	Rio das Antas	ausência	ausência	0
64	8	17/08/2013	10:00:00	Papada	Rio das Antas	ausência	ausência	0
65	8	17/08/2013	12:00:00	Pernil	Rio das Antas	ausência	ausência	0
66	8	17/08/2013	12:00:00	Barriga	Rio das Antas	ausência	ausência	0

67	8	17/08/2013	12:00:00	Paleta	Rio das Antas	ausência	ausência	0
68	8	17/08/2013	12:00:00	Papada	Rio das Antas	ausência	ausência	0
69	9	21/08/2013	07:00:00	Pernil	Videira	ausência	ausência	0
70	9	21/08/2013	07:00:00	Barriga	Videira	ausência	ausência	0
71	9	21/08/2013	07:00:00	Paleta	Videira	ausência	ausência	0
72	9	21/08/2013	07:00:00	Papada	Videira	ausência	ausência	0
73	9	21/08/2013	09:00:00	Pernil	Videira	ausência	ausência	0
74	9	21/08/2013	09:00:00	Barriga	Videira	ausência	ausência	0
75	9	21/08/2013	09:00:00	Paleta	Videira	ausência	ausência	0
76	9	21/08/2013	09:00:00	Papada	Videira	ausência	ausência	0

COLETAS DE SWAB DE MEIA CARÇAÇA PARA ANÁLISE - RS

Nº	Coleta	Data	Horário	Posição Swab	Região	Padrão	Resultado	Resultado Escherichia coli (UFC/cm ²)
1	1	18/03/2013	9:00	Pernil	Nova Alvorada	ausência	presença	1
2	1	18/03/2013	9:00	Barriga	Nova Alvorada	ausência	ausência	0
3	1	18/03/2013	9:00	Paleta	Nova Alvorada	ausência	ausência	0
4	1	18/03/2013	9:00	Papada	Nova Alvorada	ausência	ausência	0
5	1	18/03/2013	10:00	Pernil	Paverama	ausência	ausência	0
6	1	18/03/2013	10:00	Barriga	Paverama	ausência	ausência	0
7	1	18/03/2013	10:00	Paleta	Paverama	ausência	ausência	0
8	1	18/03/2013	10:00	Papada	Paverama	ausência	ausência	0
9	1	18/03/2013	12:00	Pernil	Marata	ausência	ausência	0
10	1	18/03/2013	12:00	Barriga	Marata	ausência	ausência	0
11	1	18/03/2013	12:00	Paleta	Marata	ausência	ausência	0
12	1	18/03/2013	12:00	Papada	Marata	ausência	ausência	0
13	1	18/03/2013	13:30	Pernil	Paverama	ausência	ausência	0
14	1	18/03/2013	13:30	Barriga	Paverama	ausência	ausência	0
15	1	18/03/2013	13:30	Paleta	Paverama	ausência	ausência	0
16	1	18/03/2013	13:30	Papada	Paverama	ausência	ausência	0
17	2	20/03/2013	8:15	Pernil	Arvorezinha	ausência	ausência	0
18	2	20/03/2013	8:15	Barriga	Arvorezinha	ausência	ausência	0
19	2	20/03/2013	8:15	Paleta	Arvorezinha	ausência	ausência	0
20	2	20/03/2013	8:15	Papada	Arvorezinha	ausência	ausência	0
21	2	20/03/2013	10:00	Pernil	Feliz	ausência	ausência	0
22	2	20/03/2013	10:00	Barriga	Feliz	ausência	ausência	0
23	2	20/03/2013	10:00	Paleta	Feliz	ausência	ausência	0
24	2	20/03/2013	10:00	Papada	Feliz	ausência	ausência	1

25	2	20/03/2013	13:30	Pernil	Muçum	ausência	ausência	0
26	2	20/03/2013	13:30	Barriga	Muçum	ausência	ausência	0
27	2	20/03/2013	13:30	Paleta	Muçum	ausência	ausência	0
28	2	20/03/2013	13:30	Papada	Casca	ausência	presença	2
29	2	20/03/2013	21:40	Barriga	Casca	ausência	ausência	0
30	2	20/03/2013	21:40	Pernil	Casca	ausência	ausência	0
31	2	20/03/2013	21:40	Paleta	Casca	ausência	ausência	0
32	2	20/03/2013	21:40	Papada	Putinga	ausência	ausência	0
33	3	25/03/2013	23:00	Pernil	Putinga	ausência	ausência	0
34	3	25/03/2013	23:00	Barriga	Putinga	ausência	ausência	0
35	3	25/03/2013	23:00	Paleta	Putinga	ausência	ausência	0
36	3	25/03/2013	23:00	Papada	Putinga	ausência	ausência	0
37	3	25/03/2013	23:30	Pernil	Capitão	ausência	ausência	0
38	3	25/03/2013	23:30	Barriga	Capitão	ausência	ausência	0
39	3	25/03/2013	23:30	Paleta	Capitão	ausência	ausência	0
40	3	25/03/2013	23:30	Papada	Capitão	ausência	ausência	0
41	4	27/03/2013	15:30	Pernil	Protásio Alves	ausência	ausência	0
42	4	27/03/2013	15:30	Barriga	Protásio Alves	ausência	ausência	0
43	4	27/03/2013	15:30	Paleta	Protásio Alves	ausência	ausência	0
44	4	27/03/2013	15:30	Papada	Protásio Alves	ausência	ausência	0
45	4	27/03/2013	8:26	Pernil	Vila Maria	ausência	ausência	0
46	4	27/03/2013	8:26	Barriga	Vila Maria	ausência	ausência	0
47	4	27/03/2013	8:26	Paleta	Vila Maria	ausência	ausência	0
48	4	27/03/2013	8:26	Papada	Vila Maria	ausência	presença	3
49	4	27/03/2013	10:00	Pernil	Guaporé	ausência	ausência	0
50	4	27/03/2013	10:00	Barriga	Guaporé	ausência	ausência	0
51	4	27/03/2013	10:00	Paleta	Guaporé	ausência	ausência	0
52	4	27/03/2013	10:00	Papada	Guaporé	ausência	ausência	0
53	4	27/03/2013	13:20	Pernil	Cachoeira do Sul	ausência	ausência	0
54	4	27/03/2013	13:20	Barriga	Cachoeira do Sul	ausência	ausência	0
55	4	27/03/2013	13:20	Paleta	Cachoeira do Sul	ausência	ausência	0
56	4	27/03/2013	13:20	Papada	Cachoeira do Sul	ausência	ausência	0
57	5	15/08/2013	7:55	Pernil	São José do Herval	ausência	ausência	0
58	5	15/08/2013	7:55	Barriga	São José do Herval	ausência	ausência	0
59	5	15/08/2013	7:55	Paleta	São José do Herval	ausência	ausência	0
60	5	15/08/2013	7:55	Papada	São José do Herval	ausência	ausência	0
61	5	15/08/2013	9:00	Pernil	Vespasiano Corrêa	ausência	ausência	0
62	5	15/08/2013	9:00	Barriga	Vespasiano Corrêa	ausência	presença	3
63	5	15/08/2013	9:00	Paleta	Vespasiano Corrêa	ausência	presença	5
64	5	15/08/2013	9:00	Papada	Vespasiano Corrêa	ausência	presença	10

65	5	15/08/2013	13:25	Pernil	Brochier	ausência	ausência	0
66	5	15/08/2013	13:25	Barriga	Brochier	ausência	ausência	0
67	5	15/08/2013	13:25	Paleta	Brochier	ausência	presença	3
68	5	15/08/2013	13:25	Papada	Brochier	ausência	presença	42
69	5	15/08/2013	16:15	Pernil	Nova Alvorada	ausência	ausência	0
70	5	15/08/2013	16:15	Barriga	Nova Alvorada	ausência	ausência	0
71	5	15/08/2013	16:15	Paleta	Nova Alvorada	ausência	ausência	0
72	5	15/08/2013	16:15	Papada	Nova Alvorada	ausência	ausência	0
73	5	15/08/2013	18:50	Pernil	Itapuca	ausência	ausência	0
74	5	15/08/2013	18:50	Barriga	Itapuca	ausência	presença	1
75	5	15/08/2013	18:50	Paleta	Itapuca	ausência	ausência	0
76	5	15/08/2013	18:50	Papada	Itapuca	ausência	ausência	0
77	5	15/08/2013	16:45	Pernil	Paraí	ausência	ausência	0
78	5	15/08/2013	16:45	Barriga	Paraí	ausência	ausência	0
79	5	15/08/2013	16:45	Paleta	Paraí	ausência	presença	1
80	5	15/08/2013	16:45	Papada	Paraí	ausência	presença	2
81	6	21/08/2013	8:05	Pernil	Itapuca	ausência	presença	1
82	6	21/08/2013	8:05	Barriga	Itapuca	ausência	ausência	0
83	6	21/08/2013	8:05	Paleta	Itapuca	ausência	ausência	0
84	6	21/08/2013	8:05	Papada	Itapuca	ausência	ausência	0
85	6	21/08/2013	10:15	Pernil	Colinas	ausência	presença	2
86	6	21/08/2013	10:15	Barriga	Colinas	ausência	ausência	0
87	6	21/08/2013	10:15	Paleta	Colinas	ausência	presença	2
88	6	21/08/2013	10:15	Papada	Colinas	ausência	ausência	0
89	6	21/08/2013	13:00	Pernil	Ciriaco	ausência	presença	13
90	6	21/08/2013	13:00	Barriga	Ciriaco	ausência	presença	2
91	6	21/08/2013	13:00	Paleta	Ciriaco	ausência	ausência	0
92	6	21/08/2013	13:00	Papada	Ciriaco	ausência	ausência	0
93	6	21/08/2013	14:23	Pernil	Serafina Corrêa	ausência	presença	2
94	6	21/08/2013	14:23	Barriga	Serafina Corrêa	ausência	ausência	0
95	6	21/08/2013	14:23	Paleta	Serafina Corrêa	ausência	ausência	0
96	6	21/08/2013	14:23	Papada	Serafina Corrêa	ausência	ausência	0
97	6	21/08/2013	16:15	Pernil	Tupandi	ausência	ausência	0
98	6	21/08/2013	16:15	Barriga	Tupandi	ausência	ausência	0
99	6	21/08/2013	16:15	Paleta	Tupandi	ausência	ausência	0
100	6	21/08/2013	16:15	Papada	Tupandi	ausência	presença	4
101	6	21/08/2013	18:52	Pernil	Canudos do Vale	ausência	ausência	0
102	6	21/08/2013	18:52	Barriga	Canudos do Vale	ausência	ausência	0
103	6	21/08/2013	18:52	Paleta	Canudos do Vale	ausência	ausência	0
104	6	21/08/2013	18:52	Papada	Canudos do Vale	ausência	ausência	0

105	7	29/08/2013	8:01	Pernil	Vespasiano Corrêa	ausência	ausência	0
106	7	29/08/2013	8:01	Barriga	Vespasiano Corrêa	ausência	ausência	0
107	7	29/08/2013	8:01	Paleta	Vespasiano Corrêa	ausência	presença	3
108	7	29/08/2013	8:01	Papada	Vespasiano Corrêa	ausência	ausência	0
109	7	29/08/2013	15:10	Pernil	Bom Princípio	ausência	ausência	0
110	7	29/08/2013	15:10	Barriga	Bom Princípio	ausência	ausência	0
111	7	29/08/2013	15:10	Paleta	Bom Princípio	ausência	ausência	0
112	7	29/08/2013	15:10	Papada	Bom Princípio	ausência	ausência	0
113	7	29/08/2013	17:12	Pernil	Ilópolis	ausência	ausência	0
114	7	29/08/2013	17:12	Barriga	Ilópolis	ausência	ausência	0
115	7	29/08/2013	17:12	Paleta	Ilópolis	ausência	ausência	0
116	7	29/08/2013	17:12	Papada	Ilópolis	ausência	ausência	0
117	7	29/08/2013	21:23	Pernil	Dois Lajeados	ausência	ausência	0
118	7	29/08/2013	21:23	Barriga	Dois Lajeados	ausência	ausência	0
119	7	29/08/2013	21:23	Paleta	Dois Lajeados	ausência	ausência	0
120	7	29/08/2013	21:23	Papada	Dois Lajeados	ausência	ausência	0